

БАГАЦЬКА Н. В.^{1,2✉}, НЕФІДОВА В. Є.¹, НОВОХАТСЬКА С. В.¹¹ Державна установа «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків Національної академії медичних наук України»,

Україна, 61153, м. Харків, пр. Ювілейний, 52 А, e-mail: nv_bagatska@ukr.net

² Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Україна, 61004, м. Харків, пл. Свободи, 4

✉ bagatska@ukr.net, (068) 827-17-05

ВТОРИННА АМЕНОРЕЯ У ДІВЧАТ: ГЕНЕАЛОГІЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ

Мета. Визначити генеалогічні та цитогенетичні особливості у дівчат 12–17 років із вторинною аменореєю. **Методи.** Аналіз родоводів складено в 25 сім'ях дівчат із вторинною аменореєю (ВА) (основна група) та 25 сім'ях здорових дівчат у лабораторії медичної генетики ДУ «ІОЗДП НАМН». Цитогенетичний аналіз проведено в лімфоцитах крові дівчат основної та контрольної груп *in vitro*. Контрольну групу склали 25 здорових дівчат-однолітків із регулярним менструальним циклом без соматичної патології (контрольна група). Статистичну обробку отриманих даних здійснювали із застосуванням програм *Excel* за критерієм Стьюдента. **Результати.** Визначено, що спадкова обтяженість щодо незапальних (ендокринозалежних) гінекологічних хвороб виявлялась у 60,0 % сімей, у 86,6 % випадків – за материнською лінією, у 6,7 % – за батьківською лінією, у 6,7 % – за обома лініями одночасно; 40,0 % дівчат не мали спадкової обтяженості. Загальна частота гінекологічних (незапальних) захворювань серед родичів трьох ступенів спорідненості склала 13,6 %, що майже втричі перевищувало частоту у родичок здорових дівчат (5,1 %, $p < 0,001$). Цитогенетичний аналіз, проведений у дівчат основної групи, свідчив про підвищення як загального рівня хромосомних порушень (6,2 %), так і окремих їх типів (3,2 %, 3,0 %, 1,56 %) порівняно з частотою у здорових дівчат. **Висновки.** Встановлено сімейне накопичення гінекологічних (незапальних) захворювань у родовах дівчат із ВА. Визначено цитогенетичні особливості в лімфоцитах крові хворих дівчат порівняно зі здоровими однолітками.

Ключові слова: дівчата, родоводи, цитогенетичні показники, вторинна аменорея.

Вторинна аменорея (ВА) – захворювання, яке, згідно МКХ-10, має код 91.1 та виникає у

осіб жіночої статі. Захворюваність на ВА коливається від 3,3 до 11 % в структурі всіх порушень менструальної функції у дівчат, серед яких її частота досягає 80 % [1]. Доведено, що ВА, як найбільш виражене порушення статевого дозрівання, супроводжується глибокими змінами регуляторних механізмів нейроендокринної системи і є однією з актуальних проблем сучасної підліткової ендокринної гінекології [2]. Ця хвороба зумовлена відсутністю менструації протягом 6 місяців і більше після періоду регулярних або нерегулярних менструацій. Виявлено, що ВА – мультифакторне захворювання, яке виникає внаслідок незрілості центральних механізмів регуляції репродуктивної системи, частіше на тлі зниження рівня естрогенів і секреції гонадотропінів у дівчат [3, 4]. Визначено значну кількість чинників, які спричиняють формування ВА (медико-біологічні, екологічні, соціально-гігієнічні тощо). Особливої уваги заслуговують дослідження, спрямовані на виявлення ролі генетичних чинників у формуванні вторинної аменореї. На сьогодні є незначна кількість досліджень, котрі присвячені змінам хромосомного апарату за різних порушень становлення жіночої статевої системи. Під час проведення цитогенетичного обстеження дівчат-підлітків із ВА спостерігався підвищений рівень хромосомних порушень порівняно з частотою цих аномалій у лімфоцитах крові здорових дівчат [5]. Однак, комплексного генетичного обстеження цього контингенту не проводилося. Саме тому вивчення цієї проблеми й стало метою нашого дослідження.

Матеріали і методи

Генеалогічний аналіз проведено в сім'ях 25 дівчат із ВА та 25 здорових дівчат 12–17 років за П. Харпером [6]. У родовах обстежених дівчат з'ясовували наявність захворювань ста-

тевої системи серед родичів трьох ступенів спорідненості: I ступінь – батьки, матері, рідні брати та сестри; II ступінь – бабусі, діди, полусибси (брати і сестри), дядьки, тітки; III ступінь – двоюрідні брати та сестри, полусибси.

Цитогенетичне дослідження виконувалося у 25 дівчат основної групи та 25 здорових дівчат-однolitків із регулярним менструальним циклом без соматичної патології, які були обстежені в інституті. Діагноз ВА був встановлений у відділенні дитячої гінекології; цитогенетичне обстеження дівчат обох груп проведено в лабораторії медичної генетики інституту. Матеріалом для цитогенетичного аналізу слугували препарати хромосом, отримані з культури лімфоцитів периферичної крові згідно з міжнародними вимогами [7]. Для культивування лімфоцитів периферичної крові застосовували культуральну суміш *PB-Max* (фірми *Gibco*, USA). Культивування лімфоцитів здійснювали протягом 72 годин у термостаті за температури 37 °C у двох пробках. Зупинку мітозів на стадії метафази проводили внесенням колхіцину фірми *Gipco* (USA) в культуральну суміш у кінцевій концентрації 0,1 мкг/мл. Наступним етапом була обробка культуральної суміші розчином хлориду калію (0,075 M). Фіксували клітини сумішшю 96⁰ етанолу та льодяної оцтової кислоти (співвідношення 3:1) протягом 40 хвилин із наступним триразовим центрифугуванням. Наносили суміш на мокрі охолоджені скельця. Забарвлення препаратів хромосом проводили із застосуванням барвника Гімзи (гомогенне та диференційне GTG-). Враховували всі структурні аберації хроматидного (одиначні ацентричні фрагменти, обміни) та хромосомного типів (парні ацентричні фрагменти, дицентричні хромосоми, дуплікації) та геномні порушення (поліплоїдні клітини та клітини з ендоредуплікацією). У хворих дівчат проаналізовано 2500 метафазних пластинок, у здорових однolitків – 2860 метафаз за допомогою біокулярних мікроскопів *Leica CME* (Австрія) та *Leica Gallen III* (Австрія), окуляри 10x18, об'єктиви 100x, біокулярні насадки 1,25x.

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали із застосуванням програм *Excel* за критерієм Стьюдента.

Під час проведення генетичного обстеження хворих та здорових дівчат дотримувалися принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про захист прав і гідності людини щодо застосування в біології та ме-

дицині, відповідних законів України. Протокол дослідження ухвалений Комітетом з біоетики та деонтології ДУ «ІОЗДП НАМН».

Результати та обговорення

Аналіз родоводів, проведений у сім'ях дівчат основної групи, свідчив, що спадкова обтяженість щодо незапальних (ендокринозалежних) гінекологічних хвороб виявлялась у 60,0 % сімей, у 86,6 % випадків – за материнською лінією, у 6,7 % – за батьківською лінією, у 6,7 % – за обома лініями одночасно; 40,0 % дівчат не мали спадкової обтяженості.

Загальна частота гінекологічних (незапальних) захворювань серед родичів трьох ступенів спорідненості склала 13,6 %, що майже втричі перевищувало частоту у родичок здорових дівчат (5,1 %, $p < 0,001$). Частоту хвороб серед різних категорій родичок надано у таблиці.

Крім того, у родичок трьох ступенів спорідненості з дівчатами основної групи виявлялися й інші захворювання: олігоменорея та вторинна аменорея, ранній клімакс, кіста яєчника, пубертатна маткова кровотеча, міома, пізній менархе та полікістоз. У родичок здорових дівчат реєструвалися фіброміоми матки, альгодісменорея. Встановлено, що репродуктивні порушення, зокрема такі, як безпліддя, викидні, реєструвалися тільки в родоводах дівчат із ВА, в сім'ях здорових дівчат таких порушень не виявлено.

Отже, на підставі аналізу родоводів встановлено сімейне накопичення захворювань статевих систем серед різних категорій родичок.

Цитогенетичний аналіз, проведений у дівчат основної групи, свідчив про підвищення як загального рівня хромосомних порушень, так і окремих їх типів (рис. 1).

Загальний рівень ХА в основній групі склав 6,2 на 100 клітин, а в групі порівняння – 1,92 на 100 клітин, $p < 0,001$.

Рівень аберацій хроматидного типу, до яких відносили одиначні ацентричні фрагменти (3,0 %) та хроматидно-хроматидні обміни (0,2 %) в лімфоцитах крові дівчат основної групи, також перевищував цей показник у лімфоцитах крові здорових дівчат (3,2 проти 0,97 на 100 клітин, $p < 0,001$). У здорових дівчат серед аберацій хроматидного типу визначалися лише одиначні ацентричні фрагменти (0,97 %), які формуються за ушкодження хромосоми на стадіях S і G₂.

Таблиця. Частота незапальних гінекологічних хвороб у родичок I–III ступенів спорідненості з пробандом

Категорії обстежених родичів	Загальна кількість родичів (N)	Із них із гінекологічними хворобами	
		n	\bar{x} , %
Матері	25	4	40,0
Сестри	8	2	12,5
Бабусі	49	1	6,1
Тітки	16	4	18,8
Двоюродні сестри	27	0	0,0
Прабабусі	2	0	0,0
Полусибси (сестри)	5	1	20,0

Примітки: N – усього родичів; n – кількість родичів із незапальними гінекологічними захворюваннями.

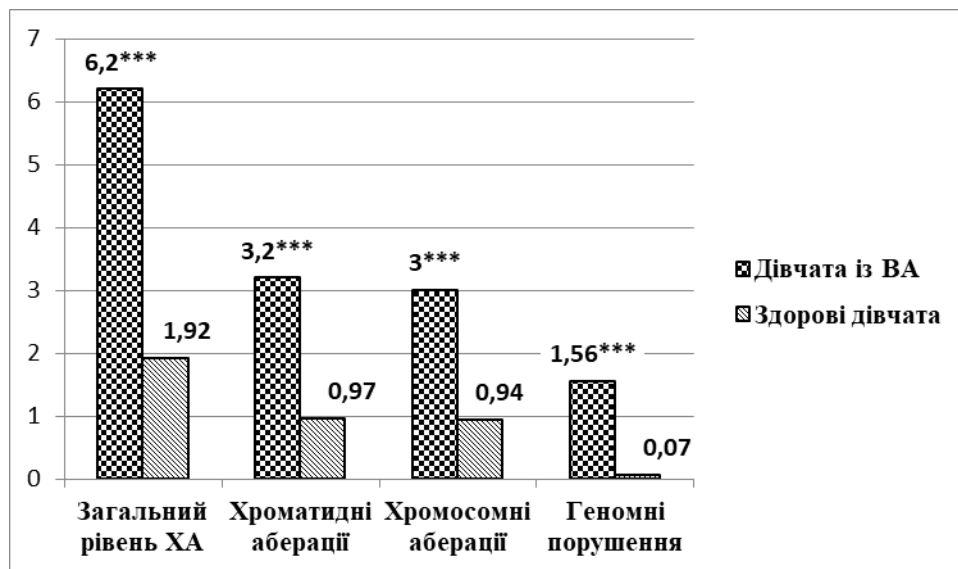


Рис. 1. Частота хромосомних порушень у лімфоцитах крові дівчат із ВА, %. *** – відмінності (порівняно з контролем) достовірні за $P < 0,001$.

Аберації хромосомного типу були представлені парними ацентричними фрагментами (2,96 %) та дуплікацією довгого плеча хромосоми з групи D (0,04 %). У здорових дівчат, крім парних ацентричних фрагментів (0,87 %), також виявлялися дицентричні хромосоми (0,07 %).

Серед геномних порушень в обох групах порівняння реєструвалися поліплоїдні клітини (1,56 в основній групі проти 0,07 в контрольній групі на 100 клітин). Клітини з ознаками ендоредуплікації реєструвалися лише в лімфоцитах крові хворих дівчат (0,6 %, $p < 0,001$).

Доведено, що поява поліплоїдних клітин у культурі лімфоцитів може бути наслідком змін в ахроматиновому апараті клітини (пошкодження скорочувальної функції ниток веретена; втрати полярності в клітині, що ділиться; стану центромер та центріолей), що пов'язано зі змінами загального фізіологічного стану клітини

або з впливом мутагенних речовин на веретено поділу [8].

Вивчення частоти хромосомних порушень у дівчат із вторинною аменореєю з обтяженим (5,8 %) та необтяженим (7,7 %) щодо незапальних гінекологічних захворювань анамнезом свідчило про однакову їх частоту в лімфоцитах периферичної крові (рис. 2).

Серед аберацій хромосомного типу переважували парні ацентричні фрагменти в обох групах порівняння (2,53 % та 3,5 %, $p > 0,05$). У дівчат з обтяженим сімейним анамнезом також визначалися дуплікації довгого плеча хромосоми з групи D (0,07 %).

Хроматидно-хроматидні обміни, які відносяться до аберацій хроматидного типу, переважували в лімфоцитах крові дівчат із необтяженим сімейним анамнезом (0,6 % проти 0,07 % відповідно, $p < 0,05$).

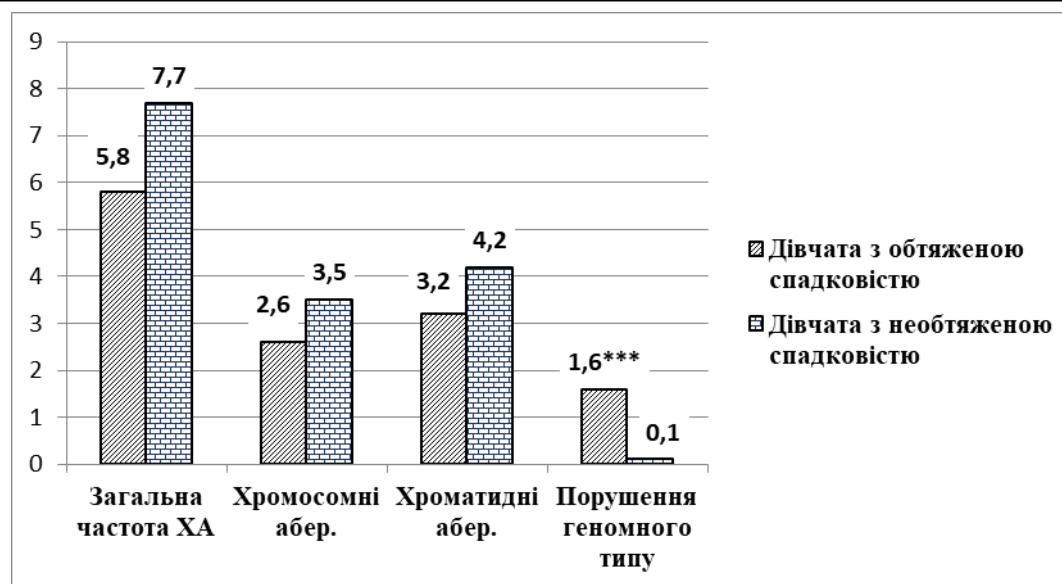


Рис. 2. Частота хромосомних порушень у лімфоцитах крові дівчат із ВА залежно від спадкової обтяженості щодо незапальних гінекологічних захворювань, %. *** – відмінності порівняно з групою порівняння достовірні за $P < 0,001$.

Порушення геномного типу, вірогідно, частіше реєструвалися у дівчат з обтяженою спадковістю за рахунок поліплоїдних клітин (0,73 % проти 0,1 % відповідно, $p < 0,01$) та передчасного розходження центромер (0,87 %, $p < 0,001$).

Таким чином, на підставі проведеного дослідження визначено сімейне накопичення ендокринозалежних гінекологічних захворювань серед родичок трьох ступенів спорідненості. За результатами цитогенетичного аналізу встановлено вірогідне підвищення як спонтанного рівня, так і окремих типів хромосомних порушень у лімфоцитах крові хворих дівчат із ВА (за порівняння зі здоровими однолітками). Отже, можна констатувати, що дівчата основної групи мали вищий рівень хромосомних порушень порівняно з частотою ХА у дівчат контрольної групи.

Висновки

1. Спадкова обтяженість щодо ендокринозалежної гінекологічної патології склала 60,0 % та, вірогідно, частіше спостерігалася за материнською лінією, ніж за батьківською та обома лініями одночасно. Загальна частота гінекологічних (незапальних) захворювань серед родичів трьох ступенів спорідненості склала 13,6 %, що майже втричі перевищувало частоту у родичок здорових дівчат (5,1 %).

2. Визначено, що індивідуальний рівень ХА у дітей основної групи підвищувався до 6,2 %, в той час як у здорових дівчат цей показник не перевищував 1,92 %. Серед порушень хромосомного апарату превалювали одиночні та парні ацентричні фрагменти.

3. Рівень структурних аберацій хромосом не мав вірогідних відмінностей у дівчат із обтяженим та необтяженим сімейним анамнезом; вірогідні відмінності визначено у частоті геномних порушень.

References

1. Borisenko M.Yu., Uvarova E.V. Current concepts of etiology and pathogenesis of secondary amenorrhea in adolescent girls (analytical review). *Reproduktivnoe zdorov'e detej i podrostkov*. 2016. 4. P. 27–47. [in Russian]
2. Nachotova T.A., Bagatskaya N.V. Secondary amenorrhea in girl adolescents: clinic-genetic aspects: monographic. New York, USA, 2018. 170 p. [in Russian]
3. Vovk I.B., Ababkova G.N., Kondratiuk V.K. Menstrual disorders in puberty. *Medychni aspekty zdorov'ya zhinky*. K., 2016. 4 (101). P. 5–18. [in Russian]
4. Belushkina N.N., Chemezov A.S., Paltsev M.A. Genetic studies of multifactorial diseases in the concept of personalized medicine: risk factors for noncommunicable diseases. *Profilakticheskaya medicina*. 2019. № 3. P. 26–30. [in Russian] doi: 10.17116/profmed20192203126.
5. Nachotova T., Nefidova V. Cytogenetic features of teenage girls with secondary amenorrhea. *GeorGian Medical news*. 2014. 11 (236). P. 78–82. [in Russian]
6. Harper P. Practical Medical Genetic Counseling. M.: Medysyna, 1989. 302 s. [in Russian]

7. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature: Published in collaboration with 'Cytogenetic and Genome Research' Plus fold-out: 'The Normal Human Karyotype G- and R-bands'. Eds. L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. Switzerland, Basel: Karger Publishers, 2013. 140 p.
8. Elbakrawy E.M., Hill M.A., Kadhim M.A. Radiation-induced Chromosome Instability: The role of dose and dose rate. *Genome Integr* [serial online]. 2019. № 10. P. 1–7. Retrieved from: <https://www.genome-integrity.org/text.asp?2019/10/1/1/269969>.

BAGATSKA N.V.^{1,2}, NEFIDOVA V.E.¹, NOVOHATSKA S.V.¹

¹ SI «Institute for Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine»,
Ukraine, 61153, Kharkiv, Jubileyny pr., 52-A

² V.N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine, 61022, Kharkiv, pl. Svobody, 4

SECONDARY AMENORRHEA IN GIRLS: GENEALOGICAL AND CYTOGENETIC FEATURES

Aim. To determine genealogical and cytogenetic features in girls aged 12-17 years with secondary amenorrhea.

Methods. The analysis of pedigrees was conducted in 25 families of girls with secondary amenorrhea (main group) and in 25 families of healthy girls in the laboratory of medical genetics of SI "ICAHN NAMS". Cytogenetic analysis was carried out in the blood lymphocytes of the girls of the main and control groups *in vitro*. The control group consisted of 25 healthy peer girls with a regular menstrual cycle without somatic pathology. The data obtained were analyzed statistically using the Student's t-test in Excel programs.

Results. The hereditary burden on non-inflammatory (hormone-dependent) gynecological diseases was found in 60.0% of families, in 86.6% of cases – along the maternal line, in 6.7% – along the paternal line, in 6.7% – on both lines at the same time; 40.0% of girls had no hereditary burden. The total incidence of gynecological (non-inflammatory) diseases among relatives of three degrees of kinship was 13.6%, which was almost three times higher than the frequency in relatives of healthy girls (5.1%, $p < 0.001$). Cytogenetic analysis conducted in girls of the main group showed an increase in both the overall level of chromosomal disorders (6.2%), and their individual types (3.2%, 3.0%, 1.56%) compared to the frequency in healthy girls.

Conclusions. Family accumulation of gynecological (non-inflammatory) diseases in the pedigree of girls with secondary amenorrhea has been established. Cytogenetic features in the blood lymphocytes of sick girls are revealed compared to healthy peers.

Keywords: girls, pedigrees, cytogenetic indices, secondary amenorrhea.