

4. Групою високого ризику виникнення ЗН при НВК були пацієнти молодого віку з тяжкою формою тотального коліту, тривалістю захворювання більше 10 років, з вираженими позакишковими симптомами хвороби, псевдополіпами та «позитивним» сімейним анамнезом за РТК.

5. Групою високого ризику виникнення ЗН при ХК були пацієнти, особливо чоловіки, з вираженими позакишковими симптомами хвороби, псевдополіпами, із «позитивним» сімейним анамнезом за ЗЗТК, РТК та ЗН іншої локалізації.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Xie J. Cancer in inflammatory bowel disease / J. Xie, S. H. Itzkowitz // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14 (3). – P. 378–389.
2. Наврузов С. Н. Неспецифічний язвенний коліт / С. Н. Наврузов, Б. С. Наврузов. – Ташкент : Шарк, 2008. – 464 с.
3. Lakatos P. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies / P. Lakatos, L. Lakatos // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 14 (25). – P. 3937–3947.
4. *Strategies of cancer prevention in gastroenterology* // К. Schulman Who has an increased risk for colorectal cancer? – Mainz, Germany : Falk workshop, 2008. – P. 109.
5. *Metaanalysis: cancer risk of low grade dysplasia in chronic ulcerative co-*

litis / T. Thomas, K. A. Abrams, R. J. Robinson, J. F. Mayberry // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 25. – P. 657–668.

6. Warren E. Genetic risk for colitis-associated colorectal cancer / E. Warren // *Gut.* – 2009. – Vol. 58. – P. 1177–1179.

7. Velayos F. S. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: a case-control study / F. S. Velayos, E. V. Loftus, T. Jess [et al.] // *Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 130. – P. 1941–1949.

8. Family history as a risk for colorectal cancer in inflammatory bowel disease / J. Askling, P. W. Dickman, P. Karlen [et al.] // *Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 120. – P. 1356–1362.

9. «Рак в Україні»: Бюлетень Національного канцер-реєстру № 13. – 2010–2011. – К., 2012.

УДК 616.345-002:616-006.6

М. Р. Лозинська, Ю. С. Лозинський, Г. С. Чайковська  
ЗНАЧЕННЯ СІМЕЙНОГО АНАМНЕЗУ У ПРОБАНДІВ ІЗ ВИСОКИМ РИЗИКОМ ВИНИКНЕННЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ, ПОВ'ЯЗАНОГО ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ТОВСТОЇ КИШКИ

Проведено клінічне обстеження, генеалогічний аналіз сімей та опрацювання медичної документації 140 пацієнтів із запальними захворюваннями товстої кишки (ЗЗТК). Установлено вірогідно вищу частоту хворих на рак товстої кишки серед родичів I і II ступенів спорідненості пробандів із ЗЗТК порівняно з контрольною групою. Рак товстої кишки розвинувся у 9 (6,4 %) осіб. Групою високого ризику виникнення злоякісних новоутворень при запальних захворюваннях виявилися пацієнти чоловічої статі з тривалістю хвороби більше 10 років, з «позитивним» сімейним анамнезом за колоректальним раком, з вираженими позакишковими симптомами хвороби і псевдополіпами.

**Ключові слова:** генеалогічний аналіз, групи ризику, рак товстої кишки, неспецифічний виразковий коліт, хвороба Крона.

UDC 616.345-002:616-006.6

М. R. Lozynska, Yu. S. Lozynskyy, H. S. Chaykovska  
THE SIGNIFICANCE OF THE FAMILIAL ANAMNESIS IN THE PROBANDS WITH HIGH RISK OF IBD-ASSOCIATED COLORECTAL CANCER

It was carried out the clinical observation, the assessment of medical documentation and the pedigree analysis of 140 patients with inflammatory bowel disease (IBD). The frequency of patients with colorectal cancer among the relatives of probands with inflammatory bowel disease was significantly higher than in patients of control group. Colorectal cancer was diagnosed in 9 (6.4%) persons. The males with disease history of more than 10 years with pronounced extraintestinal manifestations, pseudopolyps and positive familial anamnesis to colorectal cancer formed the group of high risk of IBD-associated cancer.

**Key words:** pedigree analysis, group of high risk, colorectal cancer, ulcerative colitis, Crohn's disease.

УДК 575.616.697

Л. Я. Пилип,  
В. Д. Зукін, канд. мед. наук,  
Н. М. Білько, д-р мед. наук, проф.

## ЗАСТОСУВАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ *IN SITU* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТОТИ УТВОРЕННЯ НЕЗБАЛАНСОВАНИХ ГАМЕТ У НОСІЇВ РЕЦИПРОКНИХ ТРАНСЛОКАЦІЙ

Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ,

Центр молекулярних і клітинних досліджень

Національного університету «Киево-Могилянська академія», Київ

Репродуктивні проблеми, у тому числі первинна безплідність через чоловічий фактор, а також мимовільні викидні, можуть

бути зумовленими носійством збалансованих хромосомних перебудов. Реципрокні транслокації — найчастіший тип

структурних перебудов хромосом серед пацієнтів із безплідністю [1]. Збалансовані реципрокні транслокації виникають у

результаті обміну ділянками між хромосомами без втрати генетичного матеріалу, причому точки розриву та сполучення, як правило, є випадковими, а реципрокні транслокації — індивідуальними. Гетерогенність реципрокних транслокацій унеможливує індивідуальне прогнозування частот утворення незбалансованих гамет, ускладнюючи медико-генетичне консультування, зокрема оцінку репродуктивних ризиків і прогнозування успішності проведення передімплантаційної генетичної діагностики (ПГД) у програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Відомо, що від 30 до 70 % сперматозоїдів носіїв реципрокних транслокацій мають незбалансований хромосомний набір [2–4]. Частота утворення незбалансованих гамет залежить від розмірів транслокованих районів хромосом, що визначають особливості формування тетравалентів — мейотичних структур із дериватних хромосом та їх гомологів у профазі I, тип анафазного розходження яких зумовлює утворення нормальних/збалансованих (сегрегація за альтернативним типом, Alt) або незбалансованих (сегрегація за сумісним типом-1, Adj-1), спільним типом-2 (Adj-2; 3:1) гамет (рис. 1). Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) на деконденсованих ядрах сперматозоїдів дозволяє визначити частку гамет із незбалансованим хромосомним набором.

**Метою** даної роботи було дослідити особливості сегрегації хромосом у носіїв реципрокних транслокацій з використанням FISH і проаналізувати переваги й обмеження даного методу.

#### Матеріали та методи дослідження

Реципрокні транслокації у 8 чоловіків із безплідністю були виявлені при проведенні цито-

генетичного дослідження лімфоцитів периферичної крові за стандартним методом; точки розриву і сполучення ідентифіковані при аналізі GTG-збарвлених метафазних хромосом із мінімальною роздільною здатністю 550 дисків на гаплоїдний геном.

Для проведення FISH фракцію сперматозоїдів із прямолінійно-поступальним рухом фіксували за допомогою фіксатора Карнуа, проводили деконденсацію ядер в 1 N розчині NaOH з подальшою дегідратацією у 70 та 96 % розчинах етилового спирту. Суміш проб для гібридизації підбирали індивідуально. Використовували триколірну FISH із комбінаціями центромерних, субтеломерних і локус-специфічних комерційних зондів (Vysis, Cytocell), що дозволяла виявляти усі незбалансовані варіанти хромосомного набору. Зразки денатурували в 0,25 % розчині формаміду в 2xSSC. Гібридизацію проводили за допомогою HybriMax (Abbott Molecular). Післягібридизаційна обробка предметних скельць включала промивання у 0,4xSSC/0,3 % NP-40 (pH=7) протягом 2 хв при температурі 72 °C та в 2xSSC/0,1 % NP-40 (pH=7) про-

тягом 1 хв при кімнатній температурі. Предметні скельця покривали DAPI II (Vysis). Мікроскопічне дослідження проводили за допомогою AxioImager M1 (Zeiss), результати документували у Isis (MetaSystems). Оцінювали препарати із гібридизаційною ефективністю понад 99 %. Сперматозоїди з ядрами, що перекривалися, та із порушенням цілісності головки не враховували.

Статистичний аналіз проводили в MS Excel. Для порівняння частот використовували критерій  $\chi^2$ . Варіацію частот утворення сегрегаційних продуктів оцінювали з використанням коефіцієнта варіації (V).

#### Результати дослідження та їх обговорення

Загалом проаналізовано 7659 сперматозоїдів 8 носіїв збалансованих реципрокних транслокацій, що звернулися до Клініки репродуктивної медицини «Надія» для лікування безплідності. У пацієнтів виявлено порушення сперматогенезу від астенозооспермії (АТ) до тяжкої олігоастенотератозооспермії (ОАТ) (табл. 1).

Визначення частки сперматозоїдів із нормальним/збалан-

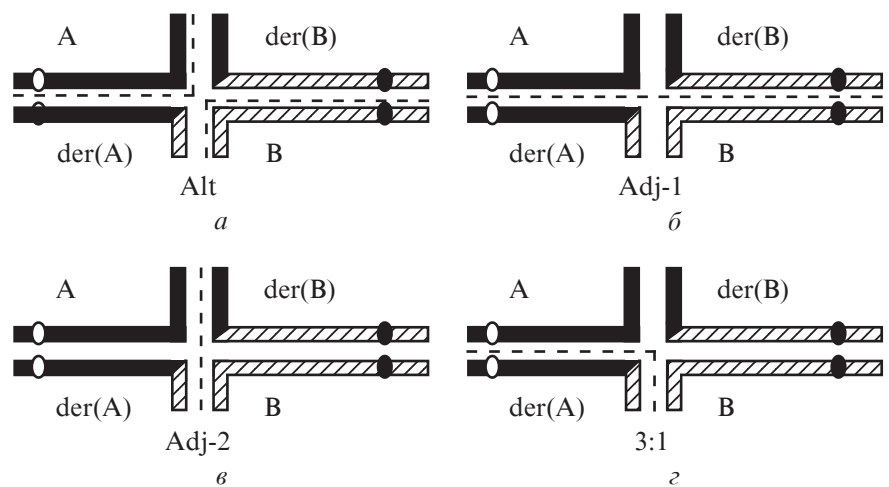


Рис. 1. Схема утворення тетравалентів у пахітені та варіанти сегрегації хромосом у гаметах носіїв реципрокних транслокацій (пунктиром позначено осі сегрегації): а — альтернативний тип сегрегації (Alt); б — сегрегація за сумісним типом-1 (Adj-1); в — сегрегація за сумісним типом-2 (Adj-2); г — сегрегація за типом 3:0 (3:0)

Таблиця 1

**Клініко-лабораторна характеристика носіїв реципрокних транслокацій**

Каріотип	Вік, років	Тип порушення сперматогенезу	Анамнез
1. 46,XY,t(6;7)(q12;p15)	34	ОАТ	Два мимовільні викидні
2. 46,XY,t(10;19)(p14;p12)	35	ОАТ	Первинна безплідність
3. 46,XY,t(5;19)(q11.1;q12)	36	АТ	Один мимовільний викидень
4. 46,XY,t(2;17)(q31;p13)	39	ОАТ	Один мимовільний викидень
5. 46,XY,t(1;10)(p36.1;p11.2)	34	ОАТ	Два мимовільні викидні
6. 46,XY,t(15;22)(q24;q11.2)	31	ОАТ	Первинна безплідність
7. 46,XY,t(1;5)(p13;q11.2)	40	АТ	Первинна безплідність
8. 46,XY,t(2;15)(q21.2;q25)	32	ОАТ	Первинна безплідність

Таблиця 2

**Результати дослідження мейотичної сегрегації хромосом у сперматозоїдах носіїв збалансованих реципрокних транслокацій**

Проба	Alt, %	Adj-1, %	Adj-2, %	3:1	Інші	N
1. CEP6, Tel6q, Tel7p	38,3	43,5	10,3	4,0	1,8	1149
2. CEP10, Tel10p, Tel19q	31,9	52,2	6,0	8,0	0,2	1072
3. CEP5, Tel5q, Tel19q	41,4	25,8	23,5	7,9	1,1	1106
4. CEP2, Tel2q, Tel17p	34,8	20,6	30,4	12,0	1,9	785
5. CEP1, Tel1p, Tel10p	51,0	24,0	20,8	2,9	1,1	1000
6. CEP15, Tel15q, Tel22q	49,7	23,2	22,4	3,9	0,2	985
7. CEP1, Tel1p, Tel5q	38,2	28,9	25,9	3,3	3,3	1033
8. CEP2, Tel2q, Tel15q	46,3	26,5	20,8	4,3	1,5	529
Середнє	41,5± ±7,0	30,6± ±11,0	20,0± ±8,1	5,8± ±3,2	1,4± ±1,0	957± ±204
V, %	17	37	40	50	—	—

сованим і незбалансованим хромосомним набором проводили методом FISH. Частота сперматозоїдів із нормальним/збалансованим хромосомним набором варіювала від 31,9 до 51 % — у середньому (41,5±7,0 %); V=17 % (табл. 2).

У сперматозоїдах носіїв реципрокних транслокацій виявлено переважне утворення незбалансованих гамет (від 49,7 до 68,1 %; у середньому (58,6±7,0) %, V=11 %). Зареєстровано значну варіабельність частот утворення гамет із сегрегаційними варіантами, що призводять до незбалансованого каріотипу: Adj-1 — від 20,6 до

52,2 % (V=36 %); Adj-2 — від 6,0 до 30,4 % (V=40 %); 3:0 — від 4 до 12 % (V=55 %). Імовірно, різниця у частотах утворення продуктів окремих типів сегрегації зумовлена особливостями транслокації, що впливають на топографію тетраваленту у профазі I, призводячи до утворення *cis*- або *trans*-конфігурації, які мають схильність до певного типу сегрегації.

Існує кілька підходів до визначення частот сегрегаційних варіантів у гаметах носіїв структурних хромосомних перебудов. Один із них — гетеровидове запліднення ооцитів хом'яка сперматозоїдами носіїв реци-

прокних транслокацій із подальшим дослідженням каріотипу зигот [5]. Висока трудомісткість і аналіз обмеженої кількості гамет унеможливають широке використання даного підходу у лабораторній практиці. Альтернативою гетеровидовому заплідненню є FISH, що дозволяє проводити експрес-діагностику збалансованості хромосомного набору значної кількості сперматозоїдів. Однак FISH допомагає ідентифікувати лише окремі хромосомні райони та не дає повного уявлення про каріотип сперматозоїдів. Тому для використання FISH сперматозоїдів із діагностичною метою критичним є створення індивідуального протоколу для дослідження сегрегації хромосом із підбором зондів, що дозволяють правильно ідентифікувати усі незбалансовані варіанти хромосомного набору [6]. Комбінація із щонайменше трьох проб дає можливість виявити дані варіанти, однак не дає змоги розділити продукти альтернативного типу сегрегації — сперматозоїди із нормальним хромосомним набором і сперматозоїди зі збалансованою транслокацією. Незважаючи на дані обмеження, доступність комерційних проб для більшості районів хромосом і надійність методу FISH сприяють проведенню ефективного та швидкого скринінгу частот утворення незбалансованих гамет у носіїв реципрокних транслокацій.

Сьогодні описано більше 100 досліджень сегрегації хромосом у носіїв індивідуальних реципрокних транслокацій, за результатами яких частота утворення незбалансованих гамет варіює від 18,6 до 62,8 % — у середньому (42,5±10,7) % [7]; у досліджуваній нами групі — від 49,7 до 68,1 % — у середньому (58,6±7,0) %.

Висока частота утворення гамет із хромосомними анома-

ліями у носіїв реципрокних транслокацій зумовлює підвищений ризик невиношування та народження дітей із незбалансованим каріотипом. Природна селекція гамет для запліднення та селекція ембріонів під час розвитку до стадії бластоцисти у програмах з використанням ДРТ знижують імовірність настання вагітності плодом із незбалансованим хромосомним набором. Проте у носіїв реципрокних транслокацій емпіричні ризики невиношування досягають 20–40 %, а народження дитини із хромосомною аномалією — від 4 %, залежно від транслокації [8]. Тому носіям реципрокних транслокацій показано проведення ПГД для перенесення у порожнину матки ембріонів із нормальним/збалансованим хромосомним набором з метою не лише зниження ризику невиношування, але й підвищення ймовірності настання вагітності [9]. У таких випадках результати дослідження сегрегації хромосом сперматозоїдів можуть бути використані для прогнозування частки нормальних/збалансованих ембріонів та відповідно успішності циклів ДРТ із ПГД.

Отже, носії реципрокних транслокацій характеризують-

ся індивідуальними частотами утворення незбалансованих гамет залежно від особливостей перебудови. Хоча флуоресцентна гібридизація *in situ* на інтерфазних ядрах сперматозоїдів носіїв транслокацій не дає повного уявлення про каріотип гамет, даний метод дозволяє швидко й ефективно визначати частку гамет із аномаліями хромосом, що залучені до транслокації. Результати дослідження сегрегації хромосом носіїв реципрокних транслокацій дають можливість індивідуалізувати репродуктивні ризики та підходи до лікування безплідності із використанням допоміжних репродуктивних технологій.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men* / A. N. Yatsenko, S. A. Yatsenko, J. W. Weedon [et al.] // *J Urol.* – 2010, Apr. – N 183 (4). – P. 1636–1642.
2. *DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality* / A. Perin, E. Caer, M. Oliver-Bonet [et al.] // *FertilSteril.* – 2009, Aug. – N 92 (2). – P. 583–589.
3. *Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology*

examination / N. G. Cassuto, N. L. Foll, S. Chantot-Bastaraud [et al.] // *FertilSteril.* – 2011, Oct. – N 96 (4). – P. 826–832.

4. *The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations* / M. Vozdova, K. Kasikova, E. Oracova [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012, Jun. – N 27 (3). – P. 930–937.

5. *Rudak E. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa* / E. Rudak, P. A. Jacobs, R. Yanagimachi // *Nature.* – 1978, Aug. – N 274. – P. 911–918.

6. *ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD* / G. L. Harton, J. C. Harper, E. Coonen [et al.] // *Hum Reprod.* – 2010, Oct. – N 1 (0). – P. 1–8.

7. *Anton E. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers* / E. Anton, F. Vidal, J. Blanco // *Hum Reprod.* – 2007, Sep. – N 22 (8). – P. 2088–2092.

8. *Gardner R. J. Chromosome abnormalities and genetic counselling. Fourth edition* / R. J. Gardner, G. R. Sutherland, L. G. Shaffer. – Oxford University Press, 2011. – 634 p.

9. *Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses* / J. Fischer, P. Colls, T. Escudero [et al.] // *FertilSteril.* – 2010, Jun. – N 94 (1). – P. 283–289.

УДК 575.616.697

Л. Я. Пилип, В. Д. Зукін, Н. М. Білько

#### ЗАСТОСУВАННЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ *IN SITU* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТОТИ УТВОРЕННЯ НЕЗБАЛАНСОВАНИХ ГАМЕТ У НОСІЇВ РЕЦИПРОКНИХ ТРАНСЛОКАЦІЙ

Проведено оцінку особливостей сегрегації хромосом у сперматозоїдах носіїв реципрокних транслокацій методом флуоресцентної гібридизації *in situ* на інтерфазних ядрах сперматозоїдів. Виявлено значне варіювання частот утворення незбалансованих гамет. Розглянуто переваги й обмеження використання методу FISH для дослідження частот незбалансованих гамет і можливості його застосування для індивідуалізації репродуктивних ризиків та підходів до лікування безплідності у носіїв реципрокних транслокацій.

**Ключові слова:** реципрокні транслокації, сегрегація хромосом, флуоресцентна гібридизація *in situ*.

UDC 575.616.697

L. Ya. Pylyp, V. D. Zukin, N. M. Bilko

#### FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION FOR THE DETECTION OF THE AMOUNT OF UNBALANCED SPERM IN RECIPROCAL TRANSLOCATION CARRIERS

Fluorescence *in situ* hybridization on decondensed interphase sperm nuclei was used to detect the amount of unbalanced sperm of reciprocal translocation carriers. A wide range in frequencies of unbalanced sperm formation was observed. Advantages and limitations of FISH studies on sperm for individualization of reproductive risks and infertility treatment protocols of reciprocal translocation carriers were discussed.

**Key words:** reciprocal translocations, chromosome segregation, fluorescence *in situ* hybridization.