

Мозаичные несбалансированные транслокации *de novo*: диагностика двух клинических случаев и обзор литературы

Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Кузина Н.Ю., Петухова М.С., Матющенко Г.Н., Шилова Н.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: maramin@mail.ru

Представлено два случая молекулярно-цитогенетической диагностики мозаичного кариотипа с несбалансированной аутоматической транслокацией и нормальной клеточной линией. *Случай 1.* Пациент обследован по поводу задержки моторного и психоречевого развития. При стандартном цитогенетическом исследовании определен нормальный кариотип. Хромосомный микроматричный анализ выявил делецию участка короткого плеча хромосомы 8 и дупликацию длинного плеча хромосомы 10. Для верификации полученных данных и установления происхождения хромосомного дисбаланса проведено FISH-исследование пробанда и его родителей, при котором у пациента был установлен мозаицизм с двумя клонами клеток: 77% клеток с несбалансированной транслокацией и 23% клеток с нормальным мужским кариотипом. *Случай 2.* Пациент обследован при рождении в связи со множественными признаками дизэмбриогенеза и подозрением на синдром «кошачьего крика». При стандартном цитогенетическом исследовании обнаружена дериватная хромосома 5. Комплексное FISH-исследование пробанда позволило определить мозаицизм с двумя клонами клеток: 88% клеток с несбалансированной транслокацией и 12% клеток с нормальным кариотипом. В работе приводится обзор случаев МНТ, обсуждаются вопросы диагностики мозаичных случаев несбалансированных транслокаций и предположительные механизмы их возникновения.

Ключевые слова: несбалансированная транслокация; мозаицизм; дериватные хромосомы; FISH-анализ.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Mosaic unbalanced translocations *de novo*: diagnosis of two clinical cases and review of the literature

Minzhenkova M.E., Markova Z.G., Kuzina N.Y., Petuhova M.S., Matushenko G.N., Shilova N.V.

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, e-mail: maramin@mail.ru

We report on a molecular cytogenetic diagnosis of mosaicism with an unbalanced autosomal translocation and a normal cell line. *Case 1.* The patient was referred for evaluation because of developmental delay. The karyotype of this patient was normal. Chromosomal micro-array analysis detected a terminal deletion of the short arm of chromosome 8 and a terminal duplication of the long arm of chromosome 10. Additional FISH analysis showed an unbalanced translocation in 77% and a normal karyotype in 23% of cells. *Case 2.* The patient was referred for Cri-du-chat syndrome. Chromosome analysis revealed a derivative chromosome 5. FISH analysis showed a mosaic karyotype with an unbalanced translocation in 88% and a normal karyotype in 12% of cells.

Key words: unbalanced translocation, mosaicism, derivative chromosome, FISH-analysis.

Введение

Мозаицизм — это наличие двух и более клеточных линий с различным хромосомным набором у одного человека. Наиболее часто мозаицизм регистрируется в случаях с гомозомными нарушениями. Мозаичные варианты, сочетающие клеточный клон с нормальным кариотипом и несбалансированной транслокацией являются крайне редкими событиями. Распространенность этих мозаичных вариантов неизвестна, так как соматический мозаицизм с аномальным клеточным клоном может быть не выявлен при стандартном цитогенетическом исследовании вследствие небольшой доли клеток с аномальным кариотипом, или даже может расцениваться как артефакт культивирования [1].

Фенотипические проявления мозаичных несбалансированных транслокаций (МНТ) зависят как от структуры хромосомной аномалии, так и от особенностей преимущественно пораженной ткани. В случае, если мозаицизм присутствует только в небольшой части клеток соматической ткани (низкоуровневый тканеспецифичный соматический мозаицизм), фенотип, вероятно, будет нормальным и, возможно, хромосомная аномалия никогда не будет диагностирована [2]. Если речь идет о поражении значительной части соматической ткани возможны дизморфии и пороки развития, а при поражении тканей головного мозга, например, будет наблюдаться умственная отсталость. Аномалия, связанная только со структурными изменениями хромосом в гонадах

(гонадный мозаицизм), не приводит к появлению аномального фенотипа у носителя и обычно распознается только после рождения двух детей с аналогичной хромосомной аномалией, либо с аналогичными дериватными хромосомами [3].

Материалы и методы

Анализ кариотипа пациентов и их родителей был выполнен на хромосомных препаратах, полученных по стандартным протоколам из культуры лимфоцитов периферической крови с применением дифференциального GTG-окрашивания метафазных хромосом. FISH-анализ с использованием субтеломерных ДНК-зондов на хромосомы 5, 8, 9, 10 (Sub Telomere 5, 8, 9, 10 pter/qter) осуществляли по протоколу, предложенному фирмой-производителем (Kreatech, Нидерланды). Многоцветную FISH (mFISH) выполняли с набором 24Xcye (MetaSystems, Германия) по протоколу фирмы-производителя. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (Abbott Molecular, США). Для контрокрасивания хромосом использовали флуоресцентный краситель DAPI. Молекулярно-цитогенетический анализ проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager M.1 (Zeiss) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки FISH-изображения (Isis, MetaSystems, Германия). Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) проводили на платформе «Affymetrix» с использованием олигонуклеотидных микроматриц высокой плотности Cytoscan™ HD (Affymetrix®, США), содержащие 2696550 маркеров (1953246 непалиморфных маркеров и 749157 SNPs) (Applied Biosystems). Все стадии лабораторного этапа анализа выполняли в соответствии с протоколом производителя — Applied Biosystems. Анализ полученных данных осуществляли с использованием программы Chromosome Analysis Suite (ChAS) (версия 2.0). Оценка патогенности обнаруженного дисбаланса проводилась с использованием баз данных OMIM, ISCA, DECIPHER и DGV. Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 2016.

Результаты

Случай 1. Пациент — 2 лет 10 месяцев обследован по поводу задержки моторного и психоречевого развития, лицевых дизморфий. При стандартном цитогенетическом исследовании кариотип пациента определен как нормальный — 46,XY. ХМА показал делецию участка короткого плеча хромосомы 8, захватывающую районы 8p23.1p23.3, размером 9,3 млн п.н. и дупликацию участка длинного плеча хромосомы 10, захватывающую районы 10q26.11q26.3, размером 14,5 млн п.н. FISH-анализ с использованием ДНК-зондов на субтеломерные районы

короткого и длинного плеч хромосомы 8 и длинного плеча хромосомы 10 подтвердил данные ХМА, и позволил установить несбалансированную транслокацию t(8;10) (рис. 1А, Б). При этом неожиданно в хромосомных препаратах из культуры лимфоцитов периферической крови пробанда был обнаружен мозаицизм с двумя клонами клеток: 77% клеток с несбалансированной транслокацией и 23% клеток с нормальным мужским кариотипом, который был также подтвержден при исследовании интерфазных ядер некультивированных клеток крови пробанда. FISH-исследование хромосомных препаратов родителей не выявило у них транслокаций.

Случай 2. Пациент — 1,5 месяцев направлен на обследование по поводу врожденных пороков развития. На основании данных осмотра предположен синдром «кошачьего крика» и проведен анализ кариотипа. При стандартном цитогенетическом исследовании кариотип пациента: 46,XY,der(5)[46]/46,XY[4] (рис. 2А). Для идентификации и характеристики дериватной хромосомы 5, а также определения уровня мозаицизма проведена комплексная FISH-диагностика. При анализе многоцветной FISH выявлено, что на коротком плече дери-

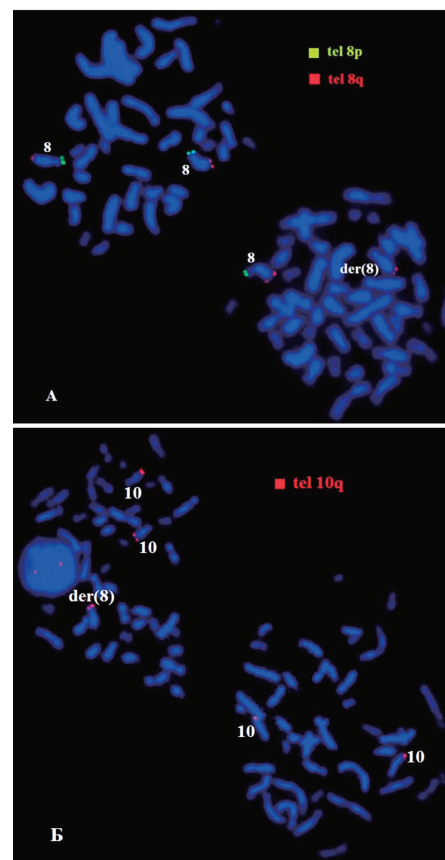


Рис. 1. Результат FISH с ДНК-зондами на субтеломерные районы короткого и длинного плеч хромосомы 8 (А) и длинного плеча хромосомы 10 (Б).

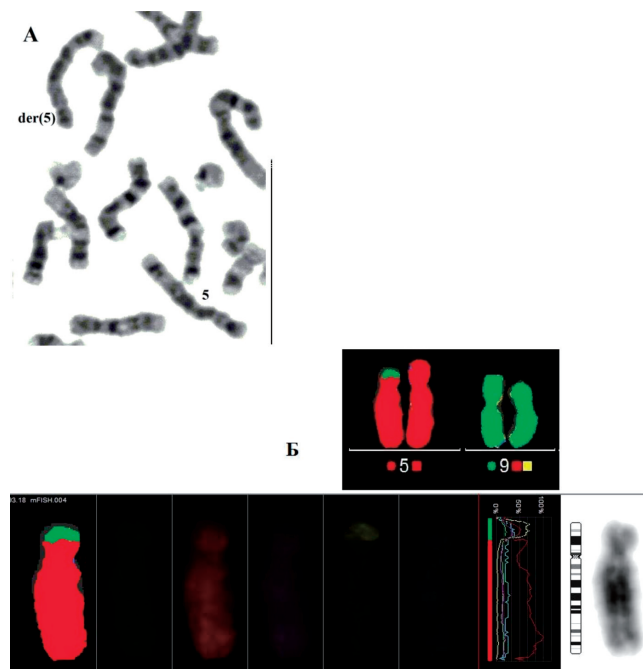


Рис. 2. А — фрагмент метафазной пластинки с дериватной хромосомой $der(5)$; Б — фрагмент mFISH с дериватной хромосомой $der(5)t(5;9)$.

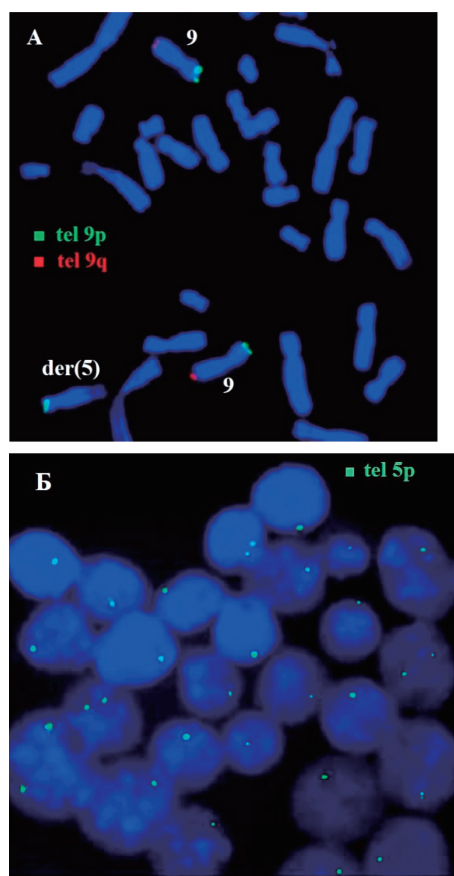


Рис. 3. Результат FISH с ДНК-зондами на субтеломерные районы короткого и длинного плеч хромосомы 9 (А) и короткого плеча хромосомы 5 (Б).

ватной хромосомы 5 присутствовал материал хромосомы 9 (рис. 2Б). Флуоресцентная *in situ* гибридизация с ДНК-зондами на субтеломерные районы короткого и длинного плеч хромосомы 9 позволила установить несбалансированную транслокацию между коротким плечом хромосомы 5 и коротким плечом хромосомы 9 (рис. 3А). При анализе интерфазных ядер (500) 88% клеток соответствовало клону с несбалансированной транслокацией $t(5;9)$, а 12% клеток — клону с нормальным мужским кариотипом (рис. 3Б).

Обсуждение

По данным литературы, к настоящему моменту имеется описание всего 18 случаев МНТ, что свидетельствует об их крайней редкости в популяции [4]. Краткая характеристика 16 ранее опубликованных и двух представленных в работе случаев МНТ приведена в таблице.

Четкую фенотип-генотип корреляцию у пациентов с МНТ проследить довольно сложно из-за мозаичного состояния хромосомного дисбаланса в крови и отсутствия данных о наличии такой же аномалии в других тканях. В ряде работ для подтверждения МНТ использовали анализ фибробластов кожи, что в условиях нашей лаборатории не представлялось возможным.

Сочетание несбалансированной транслокации и нормальной клеточной линии в кариотипе человека предположительно может формироваться несколькими путями в зависимости от возникновения мутации *de novo* или унаследованной от одного из родителей. Представленные нами случаи МНТ являются образовавшимися *de novo* и, наиболее вероятно, имеют постзиготическое происхождение. Предположительно, в изначально нормальной зиготе в период митотического деления происходит обмен участками между негомологичными хроматидами, а их последующее деление приводит к формированию нормальной и сбалансированной линий клеток. В период репликации клетка с одной из транслоцированных хроматид может утрачиваться, что в дальнейшем приводит к появлению нормальной и несбалансированной клеточной линий (рис. 4А) [5].

В случае наследственного происхождения МНТ при носительстве одним из родителей сбалансированной транслокации, мозаичный кариотип может быть результатом серии постзиготических ошибочных событий в зиготе с дериватной хромосомой. При совместной-1 сегрегации образуется гамета с одной нормальной хромосомой и одной дериватной хромосомой. При оплодотворении такой гаметы образуется зигота с несбалансированной транслокацией. Вследствие постзиготической потери дериватной хромосомы при следующем делении, происходит коррекция моносомии путем дупликации нормальной хромосомы и появляется клеточный клон с нормальным хромосомным набором (рис. 4Б). Стоит отметить, что в этом клоне будет наблюдаться изодисомия по дублированной нормальной хромосоме. Тре-

тый механизм аналогичен предыдущему и проявляется, когда имеется зигота с дериватной хромосомой и двумя нормальными гомологами, образовавшаяся в результате сегрегации 3:1 родительской транслокации. Потеря при клеточном делении нормальной хромосомы в одной клетке и дериватной хромосомы в другой клетке приведет к появлению двух различных клеточных линий (рис. 4В) [8].

Для обнаружения низкоуровневого мозаицизма по несбалансированной транслокации при стандартном цитогенетическом исследовании необходимо провести анализ значительного количества метафазных хромосом, что является трудоемким процессом. Однако даже в этом случае детекция минорного мозаичного клона не всегда представляется возможной вследствие низкой разрешающей способности глаза при хромосомных перестройках размером менее 5 млн п.н., или при наличии транслоцированных сегментов более крупного размера, но с идентичными дифференциальному окрашиванию фрагментами. Так, например, в случае 1, несмотря на довольно крупные транслоцированные сегменты дериватной хромосомы 8, первоначально при стандартном

цитогенетическом исследовании во всех клетках был установлен нормальный кариотип.

Использование высокоразрешающих полногеномных методов диагностики хромосомных аномалий, таких, как ХМА, позволяет повысить уровень детекции случаев МНТ, но не всегда дает возможность правильно оценить результаты анализа. Примечательно, что при исследовании образца 1 методом ХМА был выявлен хромосомный дисбаланс, но не установлен мозаицизм по нормальному клону, который в данном случае составил 23%. Только применение FISH-анализа помогло охарактеризовать структуру дериватных хромосом в обоих случаях и определить процент мозаицизма на большом количестве как культивированных, так и некультивированных клеток.

Несмотря на то, что мозаицизм с несбалансированной транслокацией и нормальной клеточной линией — явление чрезвычайно редкое, каждый такой случай должен быть зарегистрирован и описан, так как имеет большое значение для уточнения механизмов, лежащих в основе формирования этих хромосомных аномалий. Несомненно, для качественной диагностики МНТ не-

Таблица

Характеристика случаев мозаичных несбалансированных транслокаций

№	Кариотип	Клон с МНТ (%) КЛПК/ * ФК	Происхождение	Фенотип	Автор, год публикации
1	47,XX,der(9)t(9:9)(p13;q34)/47,XX,+mar/46,XX	100/* 84	<i>de novo</i>	Норма	Tsien et al., 1991 **
2	45,XX,-15,-18,der(18)t(15;18)(q13;q23)/46,XX	84/* 67	Неизвестно	Синдром Прадера-Вилли	Powell et al., 1991**
3	45,XY,-7,-15,der(7)t(7;15)(q34;q13)/46,XY	20/* 20	Неизвестно	ДМ, УО, пигментация кожи	Pellegrino et al., 1995**
4	46,XX,der(15)t(3;15)(q11;p11)/46,XX	0/*45	<i>de novo</i>	ДМ, УО	Stallings et al., 1997**
5	46,XX,der(4)t(4;15)(q35;q22)/46,XX	78	<i>de novo</i>	МВПР	[5]
6	46,XX,der(3)t(3;14)(q29;q31)/46,XX	83	<i>de novo</i>	ЗПМР, УО, судороги	[6]
7	46,XY,der(5)t(3;5)(p26;q35.3)/46,XY	32	<i>de novo</i>	ЗПМР, УО, гипотония	[7]
8	46,XY,der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2)/46,XY	0/*4,6	Семейный	ДМ, УО	[8]
9	46,XX,der(10)t(6;10)(p11;p11)/46,XX	4,7/*0	<i>de novo</i>	Норма	Petkovic et al., 2003**
10	46,XY,der(11)t(10;11)(q26.13;q24.2)/46,XY	87	Семейный	ДМ, УО	[9]
11	46,XX,der(22)t(8;22)(q24.2;p10)/ 46,XX	50	Неизвестно	Норма	[9]
12	46,XX,der(11)t(6;11)(q26;q24.1)/ 46,XX	60	<i>de novo</i>	ДМ, УО	[9]
13	46,X,der(Y)t(Y;13)(q12;q31.3)/46,XY	40	<i>de novo</i>	МВПР	[10]
14	46,XY,der(8)t(8;13)(p23.1;q14.3)/ 46,XY	10	<i>de novo</i>	ДМ, УО, эпилепсия	[4]
15	46,XX,der(22)t(11;22)(q23.3;q13.3)/46,XX	22,7	Неизвестно	Норма	[11]
16	46,XY,der(18)t(1;18)(q32.1;q21.3)/46,XY	7,3	<i>de novo</i>	ЗПМР, лицевые ДМ	[12]
17	46,XY,der(8)t(8;10)(p23.1;q26.11)/46,XY	77	<i>de novo</i>	ЗПМР, ДМ	Случай 1
18	46,XY,der(5)t(5;9)(p13.3;p 22)/46,XY	88	<i>de novo</i>	Синдром "кошачьего крика"	Случай 2

Примечание. КЛПК — культивированные лимфоциты периферической крови; ФК — фибробласты кожи; ДМ — дизморфии; УО — умственная отсталость; МВПР — множественные врожденные пороки развития; ЗПМР — задержка психомоторного развития; ВПС — врожденные пороки сердца. ** Ссылки на статьи представлены в работе [4]. В случаях 8, 10 — матери являлись носительницами сбалансированной транслокации.

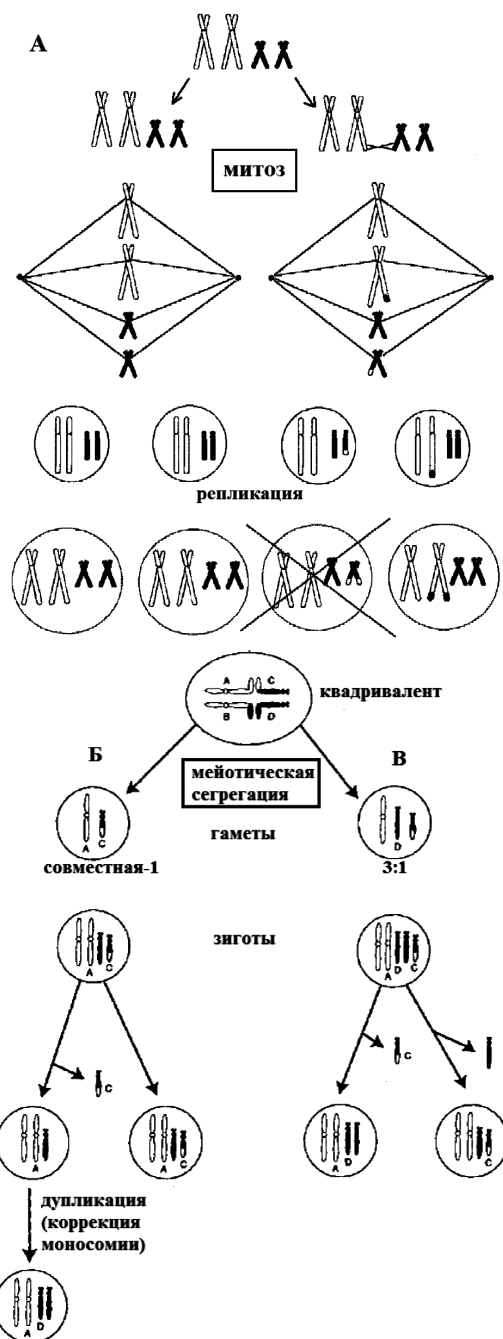


Рис. 4. Предположительный механизм формирования МНТ:
 А — *de novo* (адаптировано из работы [5]);
 Б — вследствие мейотической совместной-1 сегрегации при сбалансированной транслокации у одного из родителей (адаптировано из работы [8]);
 В — вследствие мейотической 3:1 сегрегации при сбалансированной транслокации у одного из родителей (адаптировано из работы [8]).

обходимо использовать полный комплекс методов цитогенетического исследования, включающий стандартный анализ кариотипа, молекулярно-цитогенетическую и молекулярную диагностику методами FISH и ХМА.

Список литературы

1. Ballif B.C., Rorem E.A., Sundin K., et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimen. *Am. J. Med. Genet.* 2006;140(A):2757-2767.
2. Gardner R.J., Dockery H.E., Fitzgerald P.H., et al. Mosaicism with a normal cell line and an autosomal structural rearrangement. *J. Med. Genet.* 1994;31:108-114.
3. Youssoufian H., Pyeritz R.E. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3:748-758.
4. Baranello G., Cesaretti C., Zamboni F., et al. Partial trisomy 13 and partial monosomy 8 mosaicism secondary to an unbalanced *de novo* translocation: highlighting an uncommon chromosomal abnormality. *Journal of Child Neurology.* 2013;28(11):1463-1466.
5. Zaslav A.L., Fallet S., Blumenthal D., et al. Mosaicism with a normal cell line and an unbalanced structural rearrangement. *Am J Med Genet.* 1999;82(1):15-19.
6. Reddy K.S., Sulcova V., Young H., et al. De novo mosaic add(3) characterized to be trisomy 14q31-qter using spectral karyotyping and subtelomeric probes. *Am. J. Med. Genet.* 1999;82:318-321.
7. Reddy K.S., Mak L. Mosaic unbalanced structural abnormalities confirmed using FISH on buccal mucosal cells. *Ann. Genet.* 2001;44:37-40.
8. Kulharya AS, Lovell CM, Flannery DB. Unusual mosaic karyotype resulting from adjacent 1 segregation of t(11;22): importance of performing skin fibroblast karyotype in patients with unexplained multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 2002;113(4):367-370.
9. Gijsbers A.C., Dauwerse J.G., Bosch C.A., et al. Three new cases with a mosaicism involving a normal cell line and a cryptic unbalanced autosomal reciprocal translocation. *Eur J Med Genet.* 2011;54(4):e409-e412.
10. Chen C.P., Su Y.N., Chen M., et al. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a mosaic derivative Y chromosome derived from a *de novo* unbalanced reciprocal Yq;13q translocation. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2011;50:394-398.
11. Choi J., Lee H., Lee C.G. Partial trisomy of 11q23.3-q25 inherited from a maternal low-level mosaic unbalanced translocation. *Am J Med Genet.* 2015;Part A(167A):1859-1864.
12. Choi Y.J., Shin E., Jo T.S., et al. A new mosaic der(18)t(1;18)(q32.1;q21.3) with developmental delay and facial dysmorphism. *Korean J Pediatr.* 2016;59(2):91-95. <http://dx.doi.org/10.3345/kjp.2016.59.2.91>