



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 1 / 2022 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Наследствена сфероцитоза тип 4, установена чрез цялостно екзомно секвениране

Мая Атанасоска^{1,2}, Радослава Въжарова^{1,3}, Славяна
Стайкова¹, Любомир Балабански¹, Драга Тончева^{4,5}

¹ Геномна лаборатория, СБАЛГАР „Д-р Малинов“, София

² Катедра по Генетика, Биологически факултет, Софийски
Университет „Св. Климент Охридски“

³ Катедра по Биология, медицинска генетика и микробиология,
Медицински факултет, Софийски университет
„Св. Климент Охридски“

⁴ Катедра по Медицинска генетика, Медицински факултет,
Медицински университет – София

⁵ Българска академия на науките

Резюме

Цел: Да се използва цялостно екзомно секвениране за идентифициране генетичен вариант, асоцииран с наследствена сфероцитоза при пациент от българска популация.

Материал и методи: Касае се за мъж на 39 години с характерен фенотип за наследствена сфероцитоза: един епизод на тежка хемолитична криза, ехографски данни за хепатоспленомегалия, холелитиаза, нефролитиаза и микросфероцитоза. Синът на пробанда е на 4 години с лека клинична изява на заболяването – постоянна ретикулоцитоза и продължителна неонатална жълтеница. При бащата беше проведено цялостно екзомно секвениране, докато последващото изследване на сина включваше целенасочено секвениране на екзон 17 от гена *SLC4A1*.

Резултати: Анализът на данните от екзомното секвениране на пробанда показва хетерозиготно носителство на патогенна мутация в *SLC4A1*: NM_000342.3: c.2279G>A (p.Arg760Gln), асоцииран с автосомно-доминантна форма на сфероцитоза тип 4. При таргетното секвениране патологичният вариант е установен в хетерозиготно състояние и при сина на пробанда.

Заклучение: Изследването обогати познанията относно генетичната причина на наследствената сфероцитоза в българската популация. Ранното диагностичиране е важно, тъй като помага за осъществяване на персонализиран подход към носителите на патологичен вариант и превенция на потенциални тежки усложнения. Провеждането на цялостно екзомно секвениране е полезно и препоръчително като част от рутинната клинична практика.

Ключови думи: наследствена сфероцитоза, цялостно екзомно секвениране, *SLC4A1* ген.

Hereditary spherocytosis type 4, established by whole exome sequencing

Maya Atanasoska^{1,2}, Radoslava Vazharova^{1,3},
Slavyana Staykova¹, Lyubomir Balabanski¹, Draga Toncheva^{4,5}

¹ Genomic laboratory, GARH “Malinov MD”, Sofia

² Department of Genetics, Faculty of Biology,
Sofia University “St. Kliment Ohridski”

³ Department of Biology, Medical Genetics
and Microbiology, Faculty of Medicine,
Sofia University “St. Kliment Ohridski”

⁴ Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine,
Medical University of Sofia

⁵ Bulgarian Academy of Sciences

Abstract

Aim: To identify through whole exome sequencing a pathogenic variant, associated with hereditary spherocytosis in a Bulgarian patient.

Material and methods: We describe a 39-year-old male, with characteristic phenotype of hereditary spherocytosis, including one episode of severe hemolytic anemia crisis, spherocytosis, hepatosplenomegaly, cholelithiasis and nephrolithiasis. The proband's son is 4 years old and currently has mild clinical symptoms, which include increased reticulocytes count and prolonged neonatal icterus. Whole exome sequencing was performed for the proband followed by targeted sequencing of exon 17 of the *SLC4A1* gene for his son.

Results: The analysis of whole exome sequencing data identified a heterozygous variant in the *SLC4A1* gene: NM_000342.3:c.2279G>A (p.Arg760Gln) in the proband. The pathogenic variants in the *SLC4A1* are associated with autosomal dominant form of hereditary spherocytosis type 4. The same heterozygous pathogenic variant was identified in the proband's son through targeted NGS sequencing.

Conclusion: The study expands the knowledge of genetic etiology of hereditary spherocytosis in Bulgarian patients. Identification of the underlying genetic cause is crucial for early diagnosis, which in turn provides personal approach, suitable long-term therapy and prevents complications later in life. Advances and availability of whole exome sequencing is beneficial and recommended in the routine clinical practice.

Keywords: hereditary spherocytosis, whole exome sequencing, *SLC4A1* gene.

Кореспонденция:

Мая Атанасоска MSc
e-mail: majaatanasoska@gmail.com

Correspondence:

Maya Atanasoska, MSc
e-mail: majaatanasoska@gmail.com

Въведение

Диференцирането на еритроцитите се осъществява в еритропоетичната тъкан на костния мозък. Развитието им минава през няколко фази: проеритробласт, базофилен еритробласт, полихроматофилен еритробласт, оксифилен еритробласт, който се освобождава от ядрото и преминава в ретикулоцит. Процесът на узряването на младите еритроцити (ретикулоците) в зрели, както и разграждането на част от физиологично остарелите, се осъществява в галака. Зрелите еритроцити са еластични и деформируеми клетки и могат да променят формата си без да разрушават клетъчната мембрана. Мембраната на еритроцитите е динамична и еластична биологична структура, която е устойчива при промяна на осмоларитета [1].

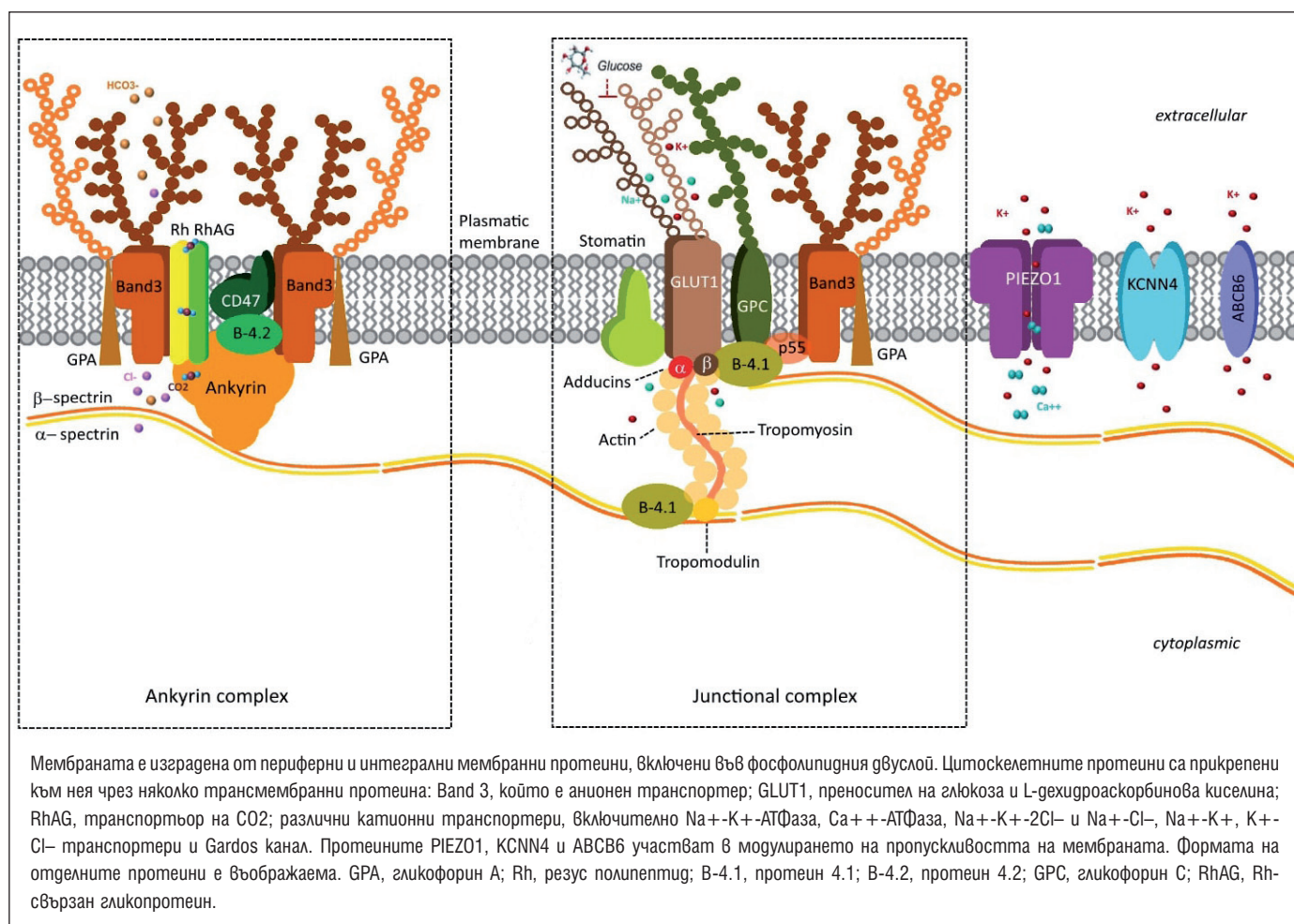
Структура на еритроцитна мембрана

Еритроцитната мембрана е изградена от липиден бислоя, съдържащ трансмембранны протеини и мембранен скелет, прикрепен към бислоя чрез свързващи протеинови комплекси (Фигура 1). Мембраната поддържа формата на еритроцитите, стабилността и деформируемостта, която е необходима за запазване на целостта им при циркулацията в кръвоносната система. Цитоскелетът и мембраната

са свързани чрез протеин-протеинови (хоризонтални) и липид-протеинови (вертикални) взаимодействия. Когато тези взаимодействия са нарушени, се нарушава формата и еластичността на клетките, което в крайна сметка води до тяхното преждевременно разрушаване и хемолитична анемия [2-3].

Липиден двуслой

Липидният двуслой на еритроцитната мембрана представлява естествена бариера, която пропуска водата и позволява ограничен обмен на различни катиони и аниони осигурявайки транспорта и натрупването им във вътрешността на еритроците [3]. Структурно се състои от липиди, гликопротеини и трансмембранны протеини, участващи в транспорта на йони и липонеразтворими молекули. По-голямата част от липидите (около 50% от общото тегло на мембраната) принадлежи на фосфолипидите (сфингомиелин, фосфатидил холин, фосфатидил етаноламин, фосфатидил серин, фосфатидил енозитол, фосфатидна киселина, лизофосфатидил холин, лизофосфатидил етаноламин) и холестерол. В малки количества се наблюдават гликолипиди и свободни мастни киселини [4-5].



Фигура 1. Структура на еритроцитната мембрана

Мембранни протеини

Мембраната съдържа около 20 първични и над 800 вторични протеини, класифицирани като: интегрални и периферни [5]. Интегралните протеини преминават през липидния двуслой и имат транспортна функция, те стабилизират прикрепването на цитоскелетната протеинова мрежа към мембраната. Техни представители са Band 3, анионен транспортер; гликофорините, които генерират отрицателен заряд на клетъчната повърхност; GLUT1, преносител на глюкоза и L-дехидроаскорбинова киселина; RhAG, транспортър на CO₂; различни катионни помпи и транспортери, включително Na⁺-K⁺-ATФаза, Ca⁺⁺-ATФаза, Na⁺-K⁺-2Cl⁻ и Na⁺-Cl⁻, Na⁺-K⁺, K⁺-Cl⁻ транспортери и Gardos канала. Към периферните мембранни протеини спадат глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (G3PD) и структурните протеини на мембрания скелет. По-детайлно представяне на мембраните протеини е направено на Фигура 1 и в Таблица 1 [4, 6].

Band 3 (SLC4A1, AE1)

Band 3 е основният интегрален мембранен протеин на еритроцитите, заема около 25–30% от протеините на клетъчната мембрана. Нарича се още анионообменен протеин 1 (AE1), но официалното му наименование е solute carrier family 4, member 1, или SLC4A1. Генът SLC4A1 кодира 120 kD полипептид, изграден от 911 аминокиселини [6-7]. Протеините Band 3 основно се намират в 3 състояния: тетрамери, димери и в така наречената свободна форма. Приблизително 40% са тетрамери в комплекс с анкирин и други интегрални протеини като заедно със спектрина изграждат анкириновия комплекс. Част от димерните форми (60%) се свързват със спектрин чрез протеин 4.1, протеин 4.2 и агуцин, създавайки актиновия комплекс, докато третата форма на протеина е в свободно дифузно състояние [7]. Протеинът съдържа два структурно и функционално различни домейни; цитоплазмен домейн с размер 43-kD със свързващи места за няколко клетъчни протеини и трансмембранен домейн с приблизително 52-kD, който образува анионообменния канал и участва в транспорта на въглероден диоксид от различните тъкани до белите дробове. Освен транспортът на CO₂, друга основна функция на Band 3 е преноса на хлоридни, бикарбонатни йони, сулфати, фосфати и пируват. В еритроцитите Band 3 взаимодейства с протеина гликофорин А, който го локализира в правилната позиция в мембраната, подпомага поддържането на формата на еритроцитите и стабилността на еритроцитната мембрана [7-8].

Патологичните варианти в Band 3 (SLC4A1) са асоциирани с наследствена сфероцитоза, наследствена стоматоцитоза, наследствена криохидроцитоза, югоизточноазиатска овалоцитоза и наследствена дистална бъбречна тубулна ацидоза [3].

Мембранен цитоскелет

Цитоскелетът на еритроцитната мембрана е изграден от: спектрин α и β -вериги, протеин 4.1, актин, тропомиозин, тропомодулин, агуцин, анкирин, дематин, част от Band 3 и протеин 4.2. Те са свързани помежду си в два протеинови комплекса: анкирин и актин свързващ комплекс. Анкирин комплекса е съставен от: Rh, RhAG, CD47, гликофорин А и протеин 4.2 докато актин свързващият комплекс се състои от 3 димери, свързващи α и β -агуцини, гликофорин С, GLUT1 и стоматин (Фигура 1). Двата комплекса заедно със свързващите протеини са гълги и понякога се свързват един с друг [3, 6].

Спектринът е изключително важен за мембрания цитоскелет, защото съдържа функционални домейни които участват в протеин-протеиновите взаимодействия. α и β веригите на спектрина чрез структурни домейни взаимодействат с другите протеини: анкирин, протеини 4.1R и 4.2, актин, агуцин и дематин. Спектринът се състои от две големи полипептидни вериги: 280-kD α верига и 246-kD β верига, които са структурно сходни, но функционално различни. Двете вериги се свързват една до друга в антипаралелна ориентация и са усукани една около друга в ясна двойна спирала [8].

Както вече споменахме, с нарушаване на вертикалните или хоризонталните взаимодействия на мембраните протеини се променя плътността на спектрина. Дефицитът на някой от протеините на еритроцитната мембрана е съпроводен с нестабилност на мембраната, промени в морфологията на еритроцитите и хемолиза (разграждане). В резултат на тези патологични промени се проявят различни хемолитични анемии [2-3]. От генетична гледна точка в OMIM (Online Mendelian Inheritance of Man) до момента са описани около 15 различни хемолитични анемии (Таблица 1). Те се разделят на 2 групи: анемии в резултат на променена структурата на еритроците и анемии в резултат на нарушена пропускливост на еритроцитната мембрана [3].

Наследствената сфероцитоза, позната още като синдром на Minkowski-Chauffard (<https://omim.org/entry/612653>), е най-често срещаната вродена хемолитична анемия. Представлява генетично хетерогенно заболяване, което се проявява при наличие на патологични варианти в някой от гените *ANK1*, *EPB42*, *SLC4A1*, *SPTA1* и *SPTB* [9]. Заболяването е с автозомно-доминантен характер, като в около 25–30% от случаите се касае за нововъзникнала (de novo) мутация. Тежестта на състоянието и клиничната картина са разнообразни дори в рамките на едно семейство, което се дължи на хетерогенната етиология [2-3, 8].

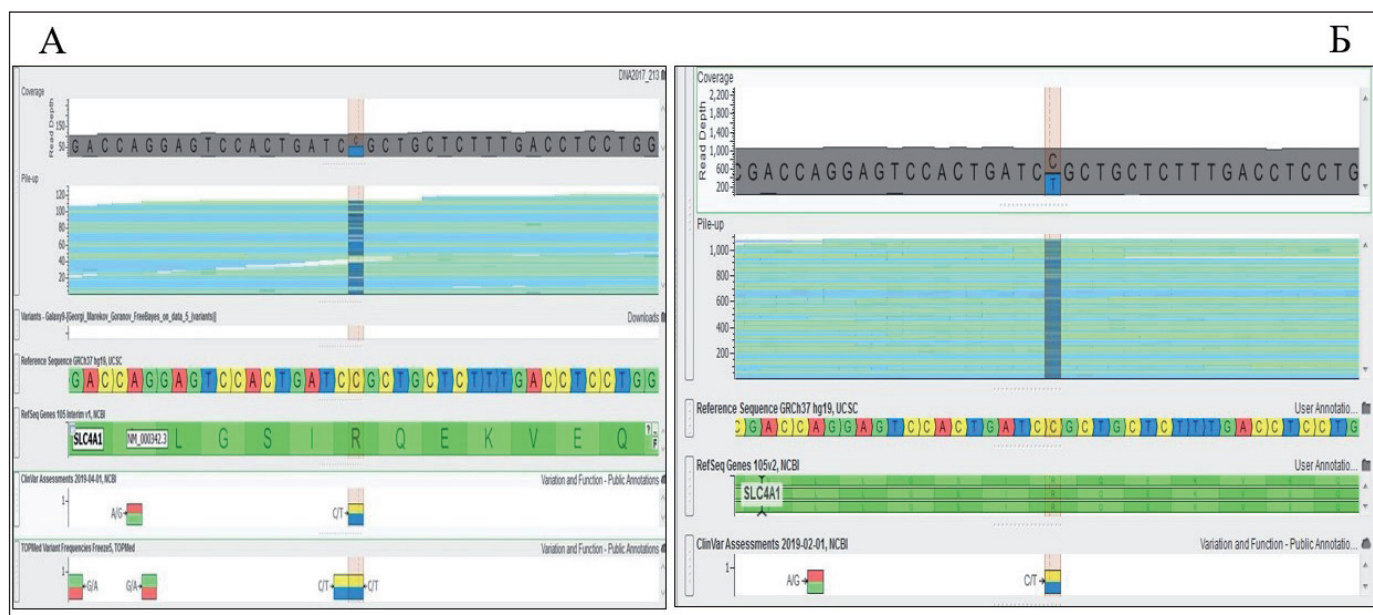
Клиничната картина се изразява в хемолитична анемия, сфероцитоза, увеличен брой ретикулоцити, намалена осмотична резистентност на еритроцитите, хипербилирубинемия, спленомегалия и иктер. При някои пациенти може

Таблица 1. Част от мембранните протеини

Протеин	И/П	Ген	Локализация	OMIM	Фенотип	Унаследяване
ABCB6	И	<i>ABCB6</i>	2q35-q36	605452	FP	АД
Ацетилхолинестераза	И	<i>ACHE</i>	7q22.1	100740		
β-актин	П	<i>ACTB</i>	7p22.1	102630		
α-агуцин	П	<i>ADD1</i>	4p16.3	102680		
β-агуцин	П	<i>ADD2</i>	2p13.3	102681		
ADP-рибозил трансфераза (CD297)	И	<i>ART4</i>	12p12.3	110600		
Алдолаза А	П	<i>ALDOA</i>	16p11.2	103850		
Анкирин 1	П	<i>ANK1</i>	8p11.2	612641	HS1	АД
Аквaporин 1	И	<i>AQP1</i>	7p14	107776		
Аквaporин 3	И	<i>AQP3</i>	9p13	600170		
Band 3	И	<i>SLC4A1</i>	17q21	109270	HS4	АД
					SAO	АД
					CHC	АД
Базигин (EMMPRIN, CD147)	И	<i>BSG</i>	19p13.3	109480	Устойчивост към малария	
Ca ²⁺ -ATPase 1	И	<i>ATP2B1</i>	12q21.3	108731		
Ca ²⁺ -ATPase 4	И	<i>ATP2B4</i>	1q32.1	108732		
Карбонилна анхидраза II	П	<i>CA2</i>	8q21.2	611492		
Карбонилна анхидраза IV	И	<i>CA4</i>	17q23.1	114760		
CD44	И	<i>CD44</i>	11p13	107269		
CD47 (IAP)	И	<i>CD47</i>	3q13.12	601028		
CD55 (DAF)	И	<i>CD55</i>	1q32.2	125240		
CD58 (LFA3)	И	<i>CD58</i>	1p13.1	153420		
CD59 (Протектин, MIRL)	И	<i>CD59</i>	11p13	107271	Хемолитична анемия с или без полиневропатия	АР
CD99	И	<i>CD99</i>	Xp22.33	313470		
CR1 (CD35)	И	<i>CR1</i>	1q32.2	120620	Устойчивост към малария	
Демантин (band 4.9)	П	<i>EPB49</i>	8p21.3	125305		
Duffy (DARC, CD234)	И	<i>DARC</i>	1q23.2	613665	Устойчивост към малария	
Флотилин 1	П	<i>FLOT1</i>	6p21.33	606998		
Флотилин 2	П	<i>FLOT2</i>	17q11.2	131560		
G3PD	П	<i>GAPDH</i>	12p13.31	138400		
Gardos канал	И	<i>KCNN4</i>	19q13.31	602754	DHS2	АД
Транспортър на глюкоза 1 (Glut1)	И	<i>SLC2A1</i>	1p34.2	138140	НС	АД
Транспортър на глюкоза 4 (Glut4)	И	<i>SLC2A4</i>	17p13.1	138190		
K ⁺ -Cl ⁻ -котранспортър 1 (KCC1)	И	<i>SLC12A4</i>	16q22.1	604119		
K ⁺ -Cl ⁻ -котранспортър 3 (KCC3)	И	<i>SLC12A6</i>	15q14	604878		
K ⁺ -Cl ⁻ -котранспортър 4 (KCC4)	И	<i>SLC12A7</i>	5p15.33	604879		

Гликофорин А	И	<i>GYPA</i>	4q31.21	111300	Устойчивост към малария	
Гликофорин В	И	<i>GYPB</i>	4q31.21	111740		
Гликофорин С/D	И	<i>GYPC/D</i>	2q14–q21	110750	Устойчивост към малария	
Kell (CD238)	И	<i>KEL</i>	7q34	613883		
Kx	И	<i>XK</i>	Xp21.1	314850	Синдром на McLeod	X-свързано
Монокарбоскилатен транспортър 1 (MCT1)	И	<i>SLC16A1</i>	1p13.2	600682		
Na ⁺ -H ⁺ exchanger 1 (NHE1)	И	<i>SLC9A1</i>	1p36.1-p35	107310		
Na ⁺ -H ⁺ exchanger 8 (NHE8)	И	<i>SLC9A8</i>	20q13.13	612730		
Na ⁺ -H ⁺ exchanger 9 (NHE9)	И	<i>SLC9A9</i>	3q24	608396		
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase, α верижа	И	<i>ATP1A1</i>	1p13.1	182310		
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase, β верижа	И	<i>ATP1B1</i>	1q24.2	182330		
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase, γ верижа	И	<i>FXYD2</i>	11q23.2	601814		
Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ -котранспортър 2 (NKCC1)	И	<i>SLC12A2</i>	5q23.3	5q23.3		
Пероксиредоксин 1	П	<i>PRDX1</i>	1p34.1	176763		
Пероксиредоксин 2	П	<i>PRDX2</i>	19p13.2	600538		
Piezo 1	И	<i>PIEZO1</i>	16q24.3	611184	DHS1	АД
Протеин 4.1R	П	<i>EPB41</i>	1p33–p34.2	130500	HE1	АД
Протеин 4.2	П	<i>EPB42</i>	15q15–q21	177070	HS5	АР
p55	И	<i>MPP1</i>	Xq28	305360		
RhAG (CD241)	И	<i>RHAG</i>	6p12.3	180297	Хемолитична анемия, Rh-нулева	АД
					OHS	АД
RhCE полипептид (CD240CE)	И	<i>RHCE</i>	1p36.11	111700	Rh-нулева болест, аморфен тип	
RhD полипептид (CD240D)	И	<i>RHD</i>	1p36.11	111680		
					HS3	АР
Спектрин α	П	<i>SPTA1</i>	1q22–q23	182860		HE2 АД HPP АР
					HS2)	АД
Спектрин β	П	<i>SPTB</i>	14q23–q24.1	182870	Наследствена елиптоцитоза тип 3 (HE3)	АД
Стоматин (band 72)	И	<i>EPB72</i>	9p33.2	133090		
Тропомодулин 1	П	<i>TMOD1</i>	9q22.33	190930		
Тропомозион 1	П	<i>TPM1</i>	15q22.2	191010		
Тропомозион 3	П	<i>TPM3</i>	1q21.3	191030		
Транспортър на уреа	И	<i>SLC14A1</i>	18q12.3	613868		
XG гликопротеин	И	<i>XG</i>	Xp22.33	314700		

И – интегрални протеини; П – периферни протеини; FP – наследствена псевдохиперкалциемия; HS1 – наследствена сфероцитоза, тип 1; HS2 – наследствена сфероцитоза тип 2; HS3 – наследствена сфероцитоза тип 3; HS4 – наследствена сфероцитоза тип 4; HS5 – наследствена сфероцитоза тип 5; SAO – южноазиатска овалоцитоза; CHC – криохидроцитоза; DHS1 – наследствена стоматоцитоза с или без псевдохиперкалциемия; DHS2 – наследствена стоматоцитоза; HC – наследствена криохидроцитоза; HE1 – наследствена елиптоцитоза тип 1; HE2 – наследствена елиптоцитоза тип 2; HE3 – наследствена елиптоцитоза тип 3; OHS – наследствена стоматоцитоза; HPP – наследствена пиропокилоцитоза; АД – автоматомно доминантно унаследяване; АР – автоматомно рецесивно унаследяване.



Фигура 2. Визуализация на варианта с.2279G>A в гена SLC4A1 при пробанда (А) и сина му (Б)

да се наблюдава засягане на дисталните тубули на бъбреците с невъзможност за алкализирание на урината и образуване на бъбречни камъни. Ранното поставяне на правилната диагноза е от съществено значение, тъй като пациентите с късно потвърждаване на диагнозата имат повишен риск от нефрологични усложнения и образуване на камъни в жлъчката в резултат на тежки хемолитични епизоди [1, 7].

Материал и методи

Пробандът е мъж на 38 години с клинични данни за хронична хемолитична анемия, едно критично спагане на хемоглобина до 60 г/л, микросфероцитоза и данни за пароксизмална нощна хемоглобинурия, налична и при майка му. Ехографският преглед показвал данни за хепатоспленомегалия, холелитиаза и нефролитиаза. Клинично-лабораторните му изследвания бяха с характерна кръвна картина: RDW – 20.6% (11.5 – 14.1), ретикулоцити – 420 x10⁹/L (55 – 140), общ билирубин – 37.79 μmol/l (до 21 μmol/l), директен билирубин – 14.38 μmol/l (1.90 – 6.50 μmol/l), индиректен билирубин – 23.00 μmol/l (3.4 – 12.0 μmol/l). При флуцитометрично изследване за пароксизмална нощна хемоглобинурия са били налични PNH-клонове в еритроцитната, гранулоцитната и моноцитната популация. От извършената миелограма имаше данни за еритробластна хиперплазия, докато при трепанобиопсията са били налице изразени промени в костния мозък с подчертана еритроидна пролиферация. До момента на изследването, 4-годишният син на пробанда има лека изява на заболяването, изразяваща се с постоянна ретикулоцитоза и продължителна неонатална жълтеница.

Първоначално беше проведено цялостно екзомно секвениране на бащата и таргетен анализ на гени асоциирани с различните хемолитични анемии. От кръвната проба

на пробанда беше изолирана и пречистена ДНК според изискванията на лабораторията изпълнител. След това пробата беше изпратена в BGI (Hong Kong), където бяха извършени подготовката на библиотеките, секвенирането и първичният биоинформатичен анализ чрез секвенатор от ново поколение (BGISEQ-500/MGI-2000 Platform) на компанията BGI. Получените ДНК последователности бяха сравнени с референтните последователности на човешкия геном. При сина беше извършено таргетно секвениране на 17-ти екзон от гена SLC4A1 (Chr17: 42,324,821 - 42,346,675) посредством платформата Illumina MiSeq.

Резултати

При бащата анализът на данните от цялостното екзомно секвениране показва хетерозиготно носителство на известен патологичен вариант в гена SLC4A1, асоцииран с автосомно-доминантна форма на наследствена сфероцитоза тип 4. При сина на пробанда таргетното секвениране на 17-ти екзон на гена SLC4A1 установи хетерозиготно носителство на същия патологичен вариант в SLC4A1 (Фигура 2).

Установеният генетичен вариант в гена SLC4A1 представлява еднуклеотидна замяна на цитозин с тимин в позиция 42330518 (GRCh37) на 17-та хромозома. Описва се като с.2279G>A на ниво транскрипт (NM_000342.4) и като p.Arg760Gln на ниво протеин (NP_000333.1), в базата данни dbSNP е описан като rs121912755. Аминокиселината аргинин на позиция 760 е еволюционно консервативна, мутациите засягат сериозно структурата и функцията на протеина [10]. През 2005 г. Врисе и сътрудници публикуват данни от експресионен анализ на варианта p.Arg760Gln в ооцитите на *Xenopus laevis* и доказват, че вариантът предизвиква нарушаване на транспорта на натриеви и калиеви йони и индуцира намален транспорт на хлоридни йони. Авторите

предполагат, че в резултат на този вариант протеинът претърпява функционална трансформация, от анионообменник преминава в канал, пропусклив за катиони [11].

Вариантът не е наблюдаван при популационни проучвания (gnomAD exomes v2.1.1) и не е съобщаван в хомозиготно състояние при здрави контроли. Докладван е в базата данни ClinVar (Variation ID: 17780) и е класифициран като патологичен. Заболяването наследствена сфероцитоза тип 4 се проявява фенотипно при хетерозиготи и има 50% вероятност от унаследяване на варианта в потомството, независимо от пола на децата. Хетерозиготните мутации в гена *SLC4A1* са най-често срещаните при наследствена сфероцитоза тип 4 [3].

Обсъждане

Анемията най-често се появява в резултат на дефицит на желязо, макар и в редки случаи понякога като причина е хемолизата. Поради препокриващия се фенотип заболяването се разпознава трудно, като най-често хроничната анемия се асоциира с дефицит на глюкозо-6-фосфат-деhidрогеназа (G6PD). Анемията настъпила в резултат на дефицит на G6PD обикновено е епизодична за разлика от анемията в резултат на хемолиза, настъпила в резултат на дефект на структурата или пропускливостта на мембраната на червените кръвни клетки, която е хронична [11-12]. Хемолитичните анемии, настъпили в резултат на нарушена структура на еритроцитите са: наследствената сфероцитоза, наследствената елиптоцитоза, наследствена пиропокилоцитоза и южноазиатска овалоцитоза, докато анемията в резултат на нарушена пропускливост на мембраната са: наследствени стоматоцитози, фамилна псевдохиперкалциемия и криохроцитоза [3].

Наследствената сфероцитоза е най-често срещаната хемолитична анемия, по епидемиологични данни честотата ѝ в Европа е 1 : 2000/5000, докато в България се установяват около 70 случая годишно. При дефицит на протеините, които участват във вертикалните взаимодействия на мембраната (спектрин, анкирин, Band 3 или протеин 4.2), еритроцитите придобиват неестествена сферична форма, те стават изключително нееластични и неустойчиви и не могат да преминат през синусоидите на далака, където се натрупват и се лизират преждевременно от моноцитно-макрофагeалната система [2-3]. Ако хемолизата не е много тежка, заболяването може да остане недиагностицирано за дълъг период, както при възрастни, така и при деца. Близко 1/3 от всички мутации, водещи до нарушаване на трансмембранните протеини на еритроцитната мембрана, се дължат на патологични промени, засягащи гликопротеина Band 3, кодиран от гена *SLC4A1* (*Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1*) [13].

Хемолитичните анемии представляват хетерогенна група с препокриващ се фенотип. На пробанга правилната диагноза му е поставена на 38 годишна възраст, като е изследван три пъти за дефицит на G6PD. Когато е налице пациент с клинични данни за хемолитична анемия, с цел разграничаване на различните хемолитични анемии, както и ранно поставяне на правилната диагноза е необходим индивидуален диагностичен подход. Освен стандартните параклинични, флуоцитометричните и имунохематологичните изследвания, последвани от инвазивните диагностични процедури, съвременните геномни изследвания са неизменна част от диагностичните методи на хемолитичните анемии [4]. Чрез цялостно екзомно секвениране беше установено хетерозиготно носителство на патологичен вариант в гена *SLC4A1* при пациент с наследствена сфероцитоза тип 4, и унаследяването на същата мутация от неговия син беше потвърдено чрез таргетно секвениране.

Заклучение

През последните години чрез използването на съвременните геномни технологии беше постигнат огромен напредък при откриването на патологични варианти и нови гени, асоциирани с редки и комплексни заболявания. В нашия случай използването на цялостното екзомно секвениране сложи край на диагностичната одисея на пациента и уточни формата на наследствена сфероцитоза като тип 4. С това се осигури прогноза на хода на заболяването и възможност за подходящо дългосрочно проследяване, избягване на усложненията на по-късен етап и планиране на профилактиката в семейството.

Библиография

1. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Apr 1;3(4):a011601.
2. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008 Oct 18;372(9647):1411-26.
3. Andolfo I, Russo R, Gambale A, et al. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016 Nov;101(11):1284-1294.
4. Lux S. Chapter 8: Red cell membrane. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, et al. *Nathan and Oski's Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. Saunders. 2 Vol, 8th Edition, 2014.
5. Aoki T. A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes (Basel)*. 2017 Sep 29;7(4):56.
6. Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016 Jan 14;127(2):187-99.
7. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med*. 2018 Sep;6(17):339.
8. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev*. 2007 Jan;21(1):1-20.
9. Wang R, Yang S, Xu M, et al. Exome sequencing confirms molecular diagnoses in 38 Chinese families with hereditary spherocytosis. *Sci China Life Sci*. 2018 Aug;61(8):947-953.

10. Jarolim P, Rubin HL, Brabec V, et al. Mutations of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane-associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. *Blood*. 1995 Feb 1;85(3):634-40.
11. Bruce LJ, Robinson HC, Guizouarn H, et al. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. *Nat Genet*. 2005 Nov;37(11):1258-63.
12. Bolton-Maggs PH. Hereditary spherocytosis; new guidelines. *Arch Dis Child*. 2004 Sep;89(9):809-12.
13. Van Zwieten R, François JJ, Van Leeuwen K, et al. Hereditary spherocytosis due to band 3 deficiency: 15 novel mutations in *SLC4A1*. *Am J Hematol*. 2013 Feb;88(2):159-60.