

<https://doi.org/10.21682/2311-1267-2024-11-4-89-97>

## К вопросу об актуальности молекулярно-генетической диагностики β-талассемии в Российской Федерации

А.Г. Хачатурян<sup>1</sup>, В.Д. Назаров<sup>2</sup>, И.А. Дубина<sup>2</sup>, С.В. Лапин<sup>2</sup>, Д.В. Сидоренко<sup>2</sup>,  
А.А. Вильгельми<sup>3</sup>, М.Ю. Первакова<sup>2</sup>, В.Л. Эмануэль<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России; Россия, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2;

<sup>2</sup>Научно-методический центр по молекулярной медицине Минздрава России ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России; Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Рентгена, 12;

<sup>3</sup>ООО «НПФ «Хеликс»; Россия, 194044, Санкт-Петербург, Большой Сампсониевский просп., 20, лит. А

**Контактные данные:** Алина Грениковна Хачатурян [khachaturianalina@gmail.com](mailto:khachaturianalina@gmail.com)

β-талассемия, являясь одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний в мире, характеризуется мутациями в гене HBB, приводящими к количественному снижению синтеза β-цепей гемоглобина. Несмотря на специфичную лабораторную картину β-талассемии, постановка диагноза может представлять трудности, особенно в ситуации малых форм/носительства β-талассемии. Общепринятый стандарт обследования включает общий анализ крови с оценкой эритроцитарных индексов, исключение железодефицитной анемии и анализ фракционного состава гемоглобина. Завершающим и ключевым этапом диагностики является проведение молекулярно-генетического исследования гена HBB, позволяющего достоверно верифицировать диагноз. В данном обзоре рассмотрены вопросы патогенеза β-талассемии, приведена обширная классификация патогенных aberrаций в гене HBB и обсуждены различные лабораторные методы каждого этапа диагностики указанного состояния с акцентом на молекулярно-генетические исследования. Имеется большой массив данных о распространенности β-талассемии в эндемичных странах, однако эпидемиологические данные в неэндемичных регионах, в частности в России, ограничены. Тем не менее, учитывая многонациональность нашей страны, исследование распространенности β-талассемии, как клинически значимых форм, так и носительства, является актуальным. В данном обзоре представлены результаты пилотного исследования минимальной распространенности β-талассемии по разработанному нами алгоритму, включающему верификацию состояния с использованием автоматического секвенирования гена HBB по Сэнгеру. По полученным данным, возможная минимальная распространенность β-талассемии в Москве составляет 0,16 %.

**Ключевые слова:** β-талассемия, ген HBB, мутации, секвенирование по Сэнгеру, распространенность, гемоглобин, гемоглобинопатии

**Для цитирования:** Хачатурян А.Г., Назаров В.Д., Дубина И.А., Лапин С.В., Сидоренко Д.В., Вильгельми А.А., Первакова М.Ю., Эмануэль В.Л. К вопросу об актуальности молекулярно-генетической диагностики β-талассемии в Российской Федерации. Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2024;11(4):89–97.

### Информация об авторах

А.Г. Хачатурян: клинический ординатор по гематологии НМИЦ им. В.А. Алмазова, e-mail: [khachaturianalina@gmail.com](mailto:khachaturianalina@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0003-3666-1508>

В.Д. Назаров: к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, лабораторный генетик лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [nazarov19932@mail.ru](mailto:nazarov19932@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>, SPIN-код: 5072-7229

И.А. Дубина: врач клинической лабораторной диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [Befunny2008@mail.ru](mailto:Befunny2008@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0001-5256-7066>, SPIN-код: 1257-4002

С.В. Лапин: к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [svlapin@mail.ru](mailto:svlapin@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>, SPIN-код: 9852-7501

Д.В. Сидоренко: врач клинической лабораторной диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [45epic@gmail.com](mailto:45epic@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>, SPIN-код: 4978-3190

А.А. Вильгельми: и. о. руководителя лабораторного комплекса ООО «НПФ «Хеликс» (Санкт-Петербург), e-mail: [Vilgelmi.a@helix.ru](mailto:Vilgelmi.a@helix.ru); <https://orcid.org/0000-0002-3142-694X>

М.Ю. Первакова: врач клинической лабораторной диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [margaritalerner@gmail.com](mailto:margaritalerner@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0001-9630-257X>, SPIN-код: 8820-5850

В.Л. Эмануэль: д.м.н., профессор, вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, академик Российской метрологической академии, директор НМЦММ Минздрава России ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, e-mail: [vladimirem1@gmail.com](mailto:vladimirem1@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>, SPIN-код: 1177-4802

### Вклад авторов

А.Г. Хачатурян: разработка дизайна статьи, сбор данных, анализ научного материала и полученных данных, написание текста рукописи

В.Д. Назаров: разработка дизайна статьи, сбор данных, анализ научного материала и полученных данных, написание текста рукописи, научная редакция статьи

И.А. Дубина: анализ научного материала, написание текста рукописи

С.В. Лапин: разработка дизайна статьи, научная редакция статьи

Д.В. Сидоренко, М.Ю. Первакова: анализ научного материала

А.А. Вильгельми: сбор данных

В.Л. Эмануэль: научная редакция статьи

## The relevance of beta-thalassemia molecular-genetic diagnostics in Russian Federation

A.G. Khachaturian<sup>1</sup>, V.D. Nazarov<sup>2</sup>, I.A. Dubina<sup>2</sup>, S.V. Lapin<sup>2</sup>, D.V. Sidorenko<sup>2</sup>, A.A. Vilgelmi<sup>3</sup>,M.Yu. Pervakova<sup>2</sup>, V.L. Emanuel<sup>2</sup><sup>1</sup>Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of Russia; 2 Akkuratova St., S.-Petersburg, 197341, Russia;<sup>2</sup>Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia; 12 Rentgena St., S.-Petersburg, 197022, Russia;<sup>3</sup>LLC "SPC "Helix"; lit. A, 20 Bolshoy Sampsonievsky Prosp., S.-Petersburg, 194044, Russia

Beta-thalassemia being one of the most widespread monogenic diseases in the world is characterized by the HBB gene mutations leading to beta-globin chain decrease. Despite of the specific laboratory features diagnosis of beta-thalassemia may seem difficult especially when speaking of minor forms and carriers. The common diagnostic standard includes complete blood count with analysis of hematological indices, iron deficiency exclusion and examination of hemoglobin fractions. The last and the crucial step is providing molecular-genetic study of HBB gene as the method allowing to verify the diagnosis. The beta-thalassemia pathogenesis, comprehensive genetic classification and various laboratory diagnostics tools are discussed in this review. There exists huge knowledge about beta-thalassemia prevalence in endemic regions but little is known of beta-thalassemia incidence in nonendemic countries, e.g., Russian Federation. Nevertheless, studying beta-thalassemia prevalence in Russia remains relevant considering multi ethnicity of Russian Federation. This review presents the diagnostics algorithm with the use of HBB gene Sanger sequencing and the results of beta-thalassemia prevalence pilot research. According to the data obtained the minimal possible beta-thalassemia incidence in Moscow accounts for 0.16 %.

**Key words:** beta-thalassemia, HBB gene, mutations, Sanger sequencing, prevalence, hemoglobin, hemoglobinopathies

**For citation:** Khachaturian A.G., Nazarov V.D., Dubina I.A., Lapin S.V., Sidorenko D.V., Vilgelmi A.A., Pervakova M.Yu., Emanuel V.L. The relevance of beta-thalassemia molecular-genetic diagnostics in Russian Federation. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2024;11(4):89–97.

## Information about the authors

A.G. Khachaturian: Clinical Resident in Hematology at Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of Russia,

e-mail: khachaturianalina@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3666-1508>V.D. Nazarov: Cand. of Sci. (Med.), Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Laboratory Geneticist of the Autoimmune Disease Diagnostics Laboratory of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: nazarov19932@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>, SPIN-code: 5072-7229I.A. Dubina: Clinical Laboratory Diagnostics Doctor of the Autoimmune Disease Diagnostics Laboratory of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: Befunny2008@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5256-7066>, SPIN-code: 1257-4002S.V. Lapin: Cand. of Sci. (Med.), Head of the Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: svlapin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>, SPIN-code: 9852-7501D.V. Sidorenko: Clinical Laboratory Diagnostics Doctor of the Autoimmune Disease Diagnostics Laboratory of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: 45epic@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>, SPIN-code: 4978-3190M.Yu. Pervakova: Clinical Laboratory Diagnostics Doctor of the Autoimmune Disease Diagnostics Laboratory of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: margaritalerner@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9630-257X>, SPIN-code: 8820-5850

A.A. Vilgelmi: Acting Head of Saint-Petersburg Laboratory Complex LLC "SPC "Helix", e-mail: Vilgelmi.a@helix.ru;

<https://orcid.org/0000-0002-3142-694X>V.L. Emanuel: Dr. of Sci. (Med.), Professor, Vice President of the Russian Association of Medical Laboratory Diagnostics, Chief Expert in Clinical Laboratory Diagnostics of Roszdravnadzor for the Northwestern Federal District, Academician of the Russian Metrology Academy, Director of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine of the Ministry of Health of the Russia at First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health of Russia, e-mail: vladimirem1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>, SPIN-code: 1177-4802

## Authors' contributions

A.G. Khachaturian: article design development, data collection, analysis of scientific material and data obtained, writing the text of the article

V.D. Nazarov: article design development, data collection, analysis of scientific material and obtained data, scientific editing of the article, writing the text of the article

I.A. Dubina: analysis of scientific material, writing the text of the article

S.V. Lapin: article design development, scientific editing of the article

D.V. Sidorenko, M.Yu. Pervakova: analysis of scientific material

A.A. Vilgelmi: data collection

V.L. Emanuel: scientific editing of the article

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** The study was performed without external funding.

## Введение

Талассемии являются группой наиболее распространенных наследуемых моногенных заболеваний — 5 % мировой популяции являются носителями минимум одного аллельного варианта, характерного для этого заболевания [1]. Талассемии характеризуются изменением качественных и количественных характеристик нормального гемоглобина эритроцитов [2].

β-талассемия, являющаяся одной из самых распространенных форм талассемий, связана с количественным нарушением синтеза β-глобина [2]. Распространенность β-талассемии значительно варьирует в мире и напрямую зависит от встречаемости малярии, вызываемой различными представителями *Plasmodium*, количество случаев которой в мире в 2022 г. составило 249 млн [3]. Изменение структуры гемоглобина или

его функциональных особенностей при талассемиях снижает вероятность проникновения паразита в эритроцит, а также увеличивает скорость клиренса зараженных красных телец, что увеличивает вероятность благоприятного исхода у зараженных [2, 4]. Так, частота носительства  $\beta$ -талассемии на Кипре составляет 12 % [5], являясь одной из самых высоких в мире. Среди других европейских стран по распространенности носительства лидируют страны Средиземноморья [6]: Италия (до 12 %), Греция (8 %), Испания (до 5 %). Высокая частота носительства зарегистрирована в Турции – до 6,8 % [7]. Странами-лидерами на Среднем Востоке [6] являются Египет (до 9 %), Иран (до 8 %), Саудовская Аравия (1–15 %), Объединенные Арабские Эмираты (8,5 %). По результатам крупного метаанализа, средняя частота встречаемости  $\beta$ -талассемии в Китае составляет 2,21 % [8]. В странах, граничащих с Российской Федерацией (РФ) или расположенных географически близко, распространенность талассемии также значительно варьирует: так, в Азербайджане она составляет 4–5 %, в Армении – 2 %, в Грузии – 3 % [9]. Популяционные данные в Киргизии, Таджикистане и Узбекистане отсутствуют. Распространенность талассемии в странах, не эндемичных по заболеваемости малярией, оценивается редко, однако данные польских исследователей, показавших расчетную распространенность  $\beta$ -талассемии, равную 1,4 %, подчеркивают актуальность исследований данной проблемы [10]. Многонациональность и этническое разнообразие РФ дают основание предполагать относительно высокую распространенность талассемий, особенно так называемых легких форм заболевания. Однако данных об истинной распространенности талассемий в РФ крайне мало и существуют только примерные расчеты, указывающие на то, что до 1 % населения могут быть иметь различные формы талассемии [11]. Большое этническое разнообразие граждан РФ также подчеркивает возможность общей высокой распространенности талассемии в стране.

### Патогенез $\beta$ -талассемии

Гемоглобин представляет собой сложную белковую молекулу (гетеротетрамер), состоящую из 2 пар цепей-глобина:  $\alpha$ - и  $\beta$ -подобных.  $\alpha$ -подобные цепи, такие как дзета ( $\zeta$ ) и альфа ( $\alpha$ ), кодируются генами, последовательно расположенными в  $\alpha$ -кластере короткого плеча 16-й хромосомы: *HBZ* и *HBA2*, *HBA1* соответственно [2].  $\beta$ -подобные цепи: эмбриональная цепь эILON ( $\epsilon$ ), фетальная цепь гамма ( $\gamma$ ) и взрослые цепи дельта ( $\delta$ ) и бета ( $\beta$ ) синтезируются последовательно с *HBE*, *HBG2* и *HBG1*, *HBD*, *HBB* генов  $\beta$ -кластера 11-й хромосомы [2].

Смена экспрессии глобиновых генов в  $\beta$ -кластере в течение онтогенеза происходит по достижении определенного возраста и приводит к последовательному образованию различных по глобиновому составу гетеротетрамеров гемоглобина, в которых одна пара цепей глобина является  $\alpha$ -подобной, другая –  $\beta$ -подобной (рис. 1). После 2 лет 96,5 % гемоглобина

представлено взрослым типом HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), 3,5 % – минорным взрослым гемоглобином HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ). Также в норме могут присутствовать следовые количества фетального гемоглобина HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), но в концентрации не более 1 % [2].

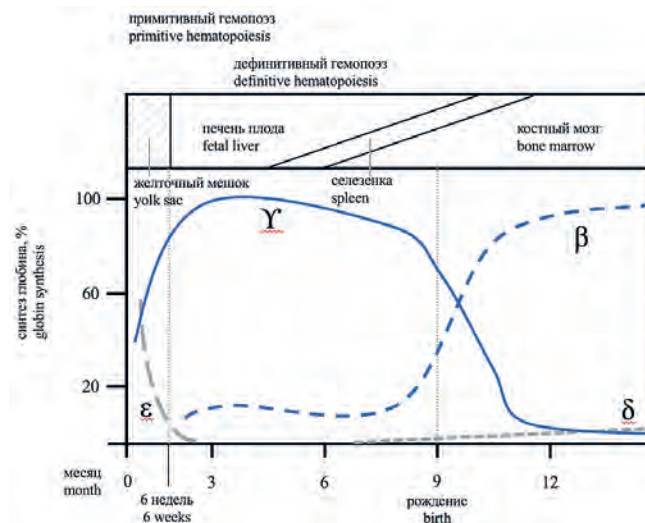


Рис. 1. Схема переключения синтеза различных цепей глобина

Fig. 1. Globin chains switching scheme

Талассемии, характеризующиеся количественным дефицитом синтеза цепей глобина, классифицируются на  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta\beta$ -,  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -талассемии и наследственное персистирование фетального гемоглобина, в зависимости от того, синтез каких цепей нарушен [2, 12]. Существует также большая группа заболеваний, ассоциированная с качественными изменениями структуры  $\beta$ -цепей глобина, – качественные гемоглобинопатии, которые, однако, не являются темой данного обзора.

Помимо талассемий к изменению концентраций минорных и мажорной фракций гемоглобина могут приводить различные нарушения его синтеза, связанные с метаболическими дефицитами (гипотиреоз, железодефицит и др.) и онкогематологическими заболеваниями (миелодиспластический синдром, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз и др.) [2].

Талассемии относят к неиммунным гемолитическим анемиям. Патогенез  $\beta$ -талассемии заключается в снижении синтеза  $\beta$ -цепей, приводящем к накоплению избытка  $\alpha$ -цепей, которые в отсутствие пары для образования HbA ( $2\alpha_2\beta$ ) формируют нерастворимые преципитаты в клетках эритроидного ростка (тельца включения). Такие преципитаты осаждаются на мембранах клетки, что делает их ригидными. Данные процессы приводят к развитию неэффективного эритропоэза в костном мозге и внутриклеточному гемолизу зрелых эритроцитов в селезенке, что выражается гипохромной микроцитарной анемией. Компенсаторно в ответ на гипоксию увеличивается синтез эритропоэтина, что приводит к гиперплазии эритроидного ростка и, как следствие, к различным скелетным деформациям плоских костей при большой форме  $\beta$ -талассемии [12].



Следует упомянуть, что степень избытка  $\alpha$ -цепей напрямую влияет на тяжесть заболевания, поэтому для редких сочетаний  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемий характерны более легкие фенотипы по сравнению с изолированной  $\beta$ -талассемией, поскольку наличие  $\alpha$ -талассемии компенсирует избыток  $\alpha$ -цепей при  $\beta$ -талассемии. Помимо  $\alpha$ -талассемии избыток  $\alpha$ -цепей может компенсировать повышенный синтез  $\gamma$ -цепей, которые соединяются с  $\alpha$ -цепями для образования HbF ( $2\alpha 2\gamma$ ) [2].

Исходя из степени количественного снижения синтеза  $\beta$ -цепей,  $\beta$ -талассемия классифицируется на большую форму ( $\beta^0$ -талассемию, анемию Кули – уст.), когда синтез  $\beta$ -цепей отсутствует полностью; промежуточную форму ( $\beta^+$ -талассемию), при которой  $\beta$ -цепи синтезируются, но их количество значительно снижено; и малую форму ( $\beta^{++}$ -талассемию), при которой синтез  $\beta$ -цепей снижен минимально [12, 13]. Большинство классификаций объединяют последнюю форму с носительством  $\beta$ -талассемии. Наиболее клинически значимая классификация выделяет трансфузионно-зависимые (в первую очередь, большая форма) и трансфузионно-независимые формы [12].

Как упомянуто выше,  $\alpha$ -цепи глобина являются продуктом экспрессии гена *HBB*, расположенного в  $\beta$ -кластере 11-й хромосомы. Главным регуляторным элементом  $\beta$ -кластера является  $\beta$ -LCR (локус-контролирующий регион), функционирующий как дистальный энхансер (distal strong enhancer) [14]. Данный регион отвечает за связывание факторов транскрипции, и при его отсутствии экспрессия  $\beta$ -глобиновых генов находится на очень низком уровне.

Ген *HBB*, суммарно кодирующий 146 аминокислот, включает 3 экзона и 2 интрона (рис. 2). Ключевыми регуляторными элементами внутри гена являются первая и последняя пары нуклеотидов интронов, обеспечивающие корректность сплайсинга РНК; консервативные консенсусные последовательности; 5'UTR (нетранслируемый регион); 3'UTR, ответственный за посттранскрипционное полиаденилирование и поли(А)-хвост, стабилизирующий молекулу РНК после процессинга, а также участвующий в трансляции [14].

Появление aberrаций в описанных регионах гена *HBB*, а также в цис- и трансрегуляторных элементах специфически влияет на синтез  $\beta$ -цепей, приводя как к количественным, так и к качественным изменениям гемоглобина [2].

Все aberrации, приводящие к развитию  $\beta$ -талассемии, можно разделить на 2 группы: делеционные и недеletionные [13].

Недеletionные варианты количественно преобладают над крупными делециями и включают в себя нуклеотидные замены, а также небольшие инсерции и делеции в пределах кодирующей области гена, приводящие к сдвигу рамки считывания. Данную группу можно классифицировать исходя из того, какой этап экспрессии нарушается – транскрипция, процессинг РНК или трансляция [13].

Транскрипционные варианты включают изменения в цис-регуляторных элементах промотора, что приводит к нарушению связывания их с факторами транскрипции, сбою взаимодействия с  $\beta$ -LCR и формированию комплекса инициации транскрипции. Помимо изменений в промоторах к нарушению транскрипции могут приводить aberrации в 5'UTR. Все перечисленные варианты ассоциированы с незначительным снижением синтеза  $\beta$ -цепей ( $\beta^+/\beta^{++}$ ) [2, 13, 15].

К aberrациям, приводящим к нарушению процессинга РНК, относятся изменения в местах стыка экзона и интрона (splice sites junction), приводящие к прекращению нормального сплайсинга интронов. К нарушению сплайсинга также приводят изменения в консенсусных последовательностях гена, которые активируют предсуществующие «криптические» места сплайсинга (последовательности, имитирующие оригинальные места сплайсинга, но в норме не используемые), а также приводящие к нарушению нормального вырезания интронов. Помимо активации «криптических» мест сплайсинга возможно также образование новых альтернативных мест сплайсинга, которые могут возникать как в интронах, так и в экзонах. Уровень снижения синтеза  $\beta$ -цепей при aberrациях, приводящих к нарушению процессинга РНК, значительно варьирует даже в одной семье и может характеризоваться либо полным отсутствием синтеза глобина, либо его небольшим снижением [2, 13, 15].

Помимо сплайсинга в ходе процессинга возможно нарушение полиаденилирования, связанное с aberrациями в консервативной последовательности ААТААА в составе 3'UTR. Возможны как точечные замены нуклеотидов и делеции в пределах последовательности, так и делеция всех 6 нуклеотидов. Перечисленные варианты снижают эффективность отщепления 3'-конца и полиаденилирования, но не прекращают их полностью, что обуславливает  $\beta^+$ -синтез цепей [2, 13, 15].

К нарушению трансляции приводят aberrации в кодоне инициации АТГ и варианты, ведущие к преждевременному появлению стоп-кодона, что вызывает в большинстве случаев полное отсутствие синтеза  $\beta$ -глобина ( $\beta^0$ ), а также наиболее многочисленные различные небольшие инсерции и делеции,



Рис. 2. Нормальная структура гена *HBB*

Fig. 2. *HBB* gene normal structure

приводящие к сдвигу рамки считывания. Уровень снижения синтеза цепей при преждевременном прекращении трансляции зависит от места появления стоп-кодона. Для нонсенс-мутаций или сдвигов рамки считывания, сопровождающихся появлением стоп-кодона в 1-м или 2-м экзоне, характерны рецессивное наследование и легкое снижение синтеза цепей у гетерозигот, поскольку с мутантных аллелей не идет синтез  $\beta$ -глобина. Таким образом, все  $\beta$ -глобиновые цепи имеют нормальную структуру, но их количество снижено. Если стоп-кодон возникает в 3-м экзоне, синтезируются нестабильные нефункционирующие варианты  $\beta$ -глобинов, что в сочетании с избытком  $\alpha$ -цепей приводит к перегрузке протеолитических механизмов и развитию тяжелого доминантно наследуемого фенотипа [2, 13, 15].

Делеционные формы встречаются значительно реже, чем недеletionные. Их можно разделить на 2 типа: делеции только гена *HBB* и делеции  $\beta$ -LCR [2]. Делеции гена *HBB* в большинстве случаев затрагивают промоторную зону с CACCC, CCAAT и TATA боксами и приводят к ограничению транскрипции *HBB* и усилению взаимодействия промоторных зон  $\gamma$ - и  $\delta$ -генов с  $\beta$ -LCR за счет снижения конкурентной способности промоторов *HBB*. В результате данный вариант  $\beta$ -талассемии характеризуется нетипично высокими уровнями HbA<sub>2</sub> и HbF и в большинстве случаев тяжелым фенотипом у гомозигот [2].

Наиболее редкими являются делеции  $\beta$ -LCR. Они могут затрагивать как регуляторный регион в сочетании с геном *HBB* и приводить к делеции всего  $\beta$ -кластера, так и оставлять *HBB* интактным. Делеции всего  $\beta$ -кластера сопровождаются развитием  $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -талассемии, причем жизнеспособными являются только гетерозиготы [2, 13].

Как было упомянуто выше,  $\beta$ -талассемия имеет различные фенотипические проявления в зависимости от количества и качества синтезируемых  $\beta$ -цепей глобина, что объясняется рецессивным типом наследования с гаплонедастачностью (неполным доминированием) [2]. Гомозиготы имеют наиболее клинически и лабораторно выраженные фенотипы в связи с тем, что синтез  $\beta$ -глобиновых цепей либо отсутствует вовсе ( $\beta^0$ -талассемия), либо значительно снижен ( $\beta^+$ -талассемия). Понятие «гаплонедастачность» относится к гетерозиготам и означает, что наличие только одной функциональной аллели не может обеспечить нормальный фенотип. Так, например, у носителей гетерозиготных аллелей синтез  $\beta$ -глобинов идет только с интактной аллели, в то время как мутированная аллель является нефункциональной. Таким образом, количество образуемых  $\beta$ -цепей недостаточно для образования пар со всеми синтезированными  $\alpha$ -цепями. При таком типе наследования гетерозиготы имеют легкий фенотип или бессимптомный, проявляющийся исключительно лабораторно ( $\beta^{++}$ -талассемия). Помимо гомо- и гетерозигот существуют компаундные гетерозиготы, чей

фенотип зависит от комбинации патологических вариантов на разных аллелях и обычно соответствует тяжелому. Выделяют также доминантно-наследуемые формы  $\beta$ -талассемии, характеризующиеся синтезом нестабильных  $\beta$ -цепей [2].

### Лабораторная диагностика $\beta$ -талассемии

Развитие анемии при  $\beta$ -талассемии имеет 2 патогенетических компонента — неэффективный эритропоэз и внутриклеточный гемолиз. Последний имеет такие лабораторные проявления, как ретикулоцитоз, повышение концентрации непрямого билирубина и лактатдегидрогеназы. Однако для легких и промежуточных форм заболевания ключевым патогенетическим звеном является неэффективный эритропоэз, нежели гемолиз, в связи с чем маркеры гемолиза у данной категории пациентов могут быть отрицательными, что не исключает диагноз  $\beta$ -талассемии [2].

Основным лабораторным проявлением  $\beta$ -талассемии является гипохромная микроцитарная анемия, которая характеризуется следующими показателями гемограммы: концентрация гемоглобина (Hb) < 130 г/л у мужчин и < 120 г/л у женщин при любом количестве эритроцитов (red blood cells, RBC), средний объем эритроцита (mean cell volume, MCV) < 80 фл и среднее содержание гемоглобина в эритроците (mean cell hemoglobin, MCH) < 27 пг [12]. Для  $\beta$ -талассемии даже при легких формах характерно значимое снижение показателей MCV (50–70 фл) и MCH (20–22 пг) [2, 12]. Важно отметить, что при  $\beta$ -талассемии часто наблюдается эритроцитоз, который является компенсаторным ответом на неэффективный эритропоэз [2]. Нужно подчеркнуть, что описанные изменения не являются специфическими и также могут присутствовать при других причинах анемии.

При микроскопии мазка периферической крови возможно обнаружение неспецифических проявлений неэффективного эритропоэза: анизоцитоз, пойкилоцитоз, мишеневидные эритроциты и нормобласты. Кроме этого, указанные морфологические особенности, в первую очередь нормобласты, выявляются не у всех пациентов и коррелируют со степенью тяжести заболевания [12, 16].

Учитывая высокую распространенность  $\beta$ -талассемии в некоторых регионах мира (Индия, страны Персидского залива), возможность сосуществования данного заболевания с железодефицитной анемией, также со схожей лабораторной картиной, были предприняты попытки создания расчетных индексов, позволяющих дифференцировать 2 данных состояния с использованием показателей общего анализа крови. Наибольшими чувствительностью и специфичностью обладают индексы, приведенные в табл. 1 [17].

Однако требуется отметить, что диагностическая точность данных индексов показывает высокий уровень вариабельности в разных популяциях. Кроме того, данные индексы разработаны для дифферен-

Таблица 1. Расчетные эритроцитарные индексы

Table 1. RBC indices

| Эритроцитарный индекс<br><i>Erythrocytic index</i> | Формула<br><i>Formula</i>       | Пороговое значение<br><i>Reference</i> | Чувствительность<br><i>Sensitivity</i> | Специфичность<br><i>Specificity</i> |
|----------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| Mentzner                                           | MCV/RBC                         | < 13,0                                 | 98,7 %                                 | 82,3 %                              |
| Ehsani                                             | MCV × (10 × RBC)                | < 15,0                                 | 94,8 %                                 | 73,5 %                              |
| Srivastava                                         | MCH/RBC                         | < 3,8                                  | 85,7 %                                 | 72,0 %                              |
| Sirdah                                             | MCV – RBC – (3 × Hb)            | < 27,0                                 | 85,7 %                                 | 79,4 %                              |
| RDWI                                               | MCV × RDW/RBC                   | < 220,0                                | 83,1 %                                 | 76,4 %                              |
| Green and King                                     | MCV <sup>2</sup> × RDW/Hb × 100 | < 65,0                                 | 83,1 %                                 | 73,5 %                              |
| Shine and Lal                                      | MCV <sup>2</sup> × MCH/100      | < 1530,0                               | 100,0 %                                | 10,2 %                              |
| England and Fraser                                 | MCV – RBC – (0,5 × Hb) – 3,4    | < 0                                    | 66,2 %                                 | 85,3 %                              |

Примечание. RDW – ширина распределения эритроцитов.

Note. RDW – red cell distribution width.

циальной диагностики между разными причинами гипохромной микроцитарной анемии, а не для рутинного скрининга β-талассемии среди условно здорового населения.

Характерным признаком β-талассемии является изменение соотношения HbA, HbA2 и HbF, отражающее снижение продукции β-цепей и компенсаторное увеличение синтеза δ-цепей и/или γ-цепей. Обычно при β-талассемии наблюдается умеренное повышение HbA2 (3,5–7,0 %) или сочетанное повышение HbA2 и HbF. В некоторых случаях, например при δβ-талассемиях или наследственной персистенции фетального гемоглобина, может наблюдаться изолированное повышение HbF [18]. Данный феномен количественных изменений нормальных фракций гемоглобина также используется в качестве инструмента для определения пациентов с высокой вероятностью наличия β-талассемии.

Гель-электрофорез в агарозном геле в щелочных (pH = 8,4) и кислых (pH = 6,2) условиях с последующей окраской белковыми красителями и денситометрией является довольно устаревшим методом с низким уровнем разрешающей способности и отсутствием возможности высокоточной оценки концентрации нормальных фракций гемоглобинов [19, 20].

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭФ) являются более современными подходами оценки качественного и количественного состава фракций гемоглобина. Разделение гемоглобинов на фракции методом ВЭЖХ заключается в предварительной сорбции всех вариантов гемоглобина на катионообменной колонке с последующим разделением на фракции элюирующим буфером. При этом каждый вариант гемоглобина имеет свое уникальное значение величины, называемой «время удержания». Однако многие варианты гемоглобинов имеют схожее время удержания, что может усложнять оценку концентраций нормальных фракций гемоглобина. Усложняет задачу и тот факт, что в этом методе также разделяются на фракции гликозилированные формы и другие производные гемоглобина [20]. Большинство исследователей склоняются к тому, что ВЭЖХ не следует использовать как самостоятельный метод окончательной идентификации варианта гемоглобина [21, 22].

При использовании КЭФ различные варианты гемоглобина характеризуются определенными зонами миграции в зависимости от их электрофоретической подвижности. Данные миграционные зоны менее специфичны, чем время удержания в ВЭЖХ: иногда эти зоны шире и включают в себя несколько вариантов гемоглобина с близкой электрофоретической подвижностью, что также усложняет интерпретацию результатов и снижает точность оценки нормальных фракций гемоглобина [23].

В некоторых регионах мира с особенно высокой распространенностью β-талассемии используется специфическое определение концентрации HbA2 и HbF для скрининга на данное состояние [24, 25]. Однако данный подход обладает значительными недостатками: невозможность определения структурных гемоглобинопатий и сложных форм структурных и количественных гемоглобинопатий, существование большого количества других причин повышения нормальных вариантов гемоглобина (B<sub>12</sub>-дефицит, беременность, гипертиреоз, диабет и др.).

Диагностическим лабораторным тестом, позволяющим верифицировать диагноз, является проведение молекулярно-генетического исследования гена *HBB* для обнаружения патогенных вариантов, что делает данный тест «золотым стандартом» диагностики β-талассемии. Методы молекулярно-генетической диагностики β-талассемии могут быть основаны на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенировании по Сэнгеру, а также на методе массового параллельного секвенирования.

Международная федерация по талассемиям рекомендует для генодиагностики ПЦР-методику с использованием готовых тест-систем с наборами проб/праймеров для выявления наиболее частых мутаций в регионе [12]. Указанный метод высоко актуален для эндемичных регионов, тем не менее в таких многонациональных неэндемичных странах, как РФ, использование данных наборов не может обеспечить гарантированное выявление заболевания в связи с высоким разнообразием возможных патогенных aberrаций в гене *HBB*.

Как было описано ранее, к развитию заболевания могут приводить aberrации в любом участке гена, включая регуляторные и некодирующие области.



В связи с этим необходимым условием полноценного молекулярно-генетического поиска является анализ промоторной зоны, кодирующих участков, интронов, а также 3'UTR нетранслируемого региона гена *HBB*. Одним из наиболее точных и эффективных методов определения патогенных вариантов в гене *HBB* является прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру, позволяющее идентифицировать практически все известные на данный момент aberrации при использовании праймеров, направленных на исследование всех участков гена [12].

На рис. 3 представлен предпочтительный охват областей гена *HBB* при использовании секвенирования по Сэнгеру.

Ограничением использования данной методики является невозможность обнаружения крупных делеций, однако данные aberrации характеризуются развитием большой формы  $\beta$ -талассемии с выраженной клинико-лабораторной картиной, что при получении отрицательного результата секвенирования является основанием для проведения другого молекулярно-генетического исследования — множественной амплификации лигированных проб (MLPA) [26]. Тем не менее встречаемость делеционных форм крайне низка, в связи с чем необходимость выполнения MLPA для диагностики  $\beta$ -талассемии носит исключительный характер.

Сегодня все больше в рутинной клинической практике при диагностике наследственных заболеваний используются методы массового параллельного секвенирования (секвенирование следующего поколения, NGS). Однако, как и другие лабораторные и молекулярно-генетические методы, данные тесты имеют ряд ограничений. Непонимание особенностей NGS-технологий при генетическом подтверждении  $\beta$ -талассемии может привести к ложноотрицательным результатам. Так, использование полноэкзомного секвенирования не позволяет выявить весь спектр патогенных вариантов, которые, как было упомянуто ранее, могут встречаться и в некодирующих, и в регуляторных областях гена *HBB*. Это заставляет разрабатывать таргетные панели, которые будут анализировать все диагностически важные регионы данного гена. Также наличие псевдогена *HBBP1* еще больше усложняет молекулярно-генетическую диагностику

$\beta$ -талассемии с использованием метода NGS и подчеркивает важность учета данного феномена при дизайне таргетных панелей.

#### Собственный опыт оценки минимальной распространенности $\beta$ -талассемии с использованием молекулярно-генетического метода диагностики

Данные о частоте встречаемости  $\beta$ -талассемии в РФ немногочисленны [11, 27], а имеющиеся публикации указывают на вероятное увеличение заболеваемости в связи с активными миграционными процессами [11]. Для оценки минимальной распространенности  $\beta$ -талассемии было проведено пилотное исследование. Его схема визуализирована на рис. 4.

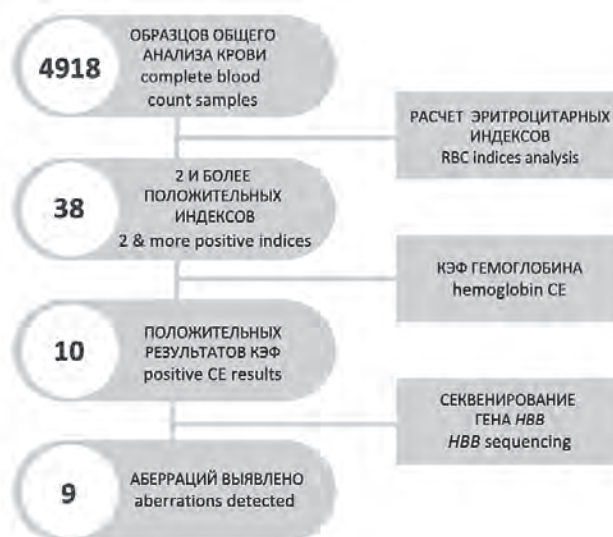


Рис. 4. Дизайн исследования

Fig. 4. Study design. CE — capillary electrophoresis

На 1-м этапе были проанализированы гематологические данные (RBC, Hb, MCV, MCH) 4918 обезличенных уникальных образцов общего анализа крови. Нами были использованы остаточные образцы крови пациентов, проходивших обследование по различным неуточненным причинам в лаборатории г. Москвы в период с 22.05.2022 по 23.05.2022. Наличие анемии не являлось критерием включения. Нужно отметить, что данное исследование не следует рассматривать как популяционное, так как большое количество образ-

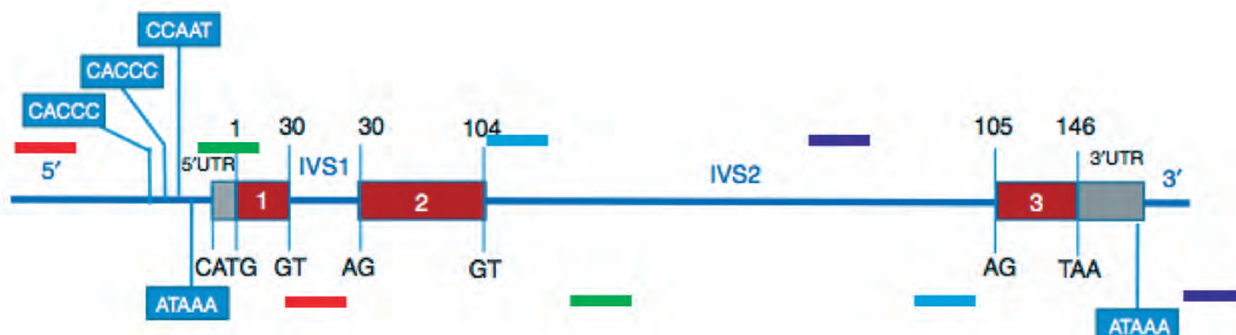


Рис. 3. Расположение праймеров при секвенировании по Сэнгеру

Fig. 3. Sanger sequencing primers location

цов, поступивших в лабораторию, могло быть сдано по медицинским показаниям. Мы также принимаем во внимание тот факт, что медицинские состояния, помимо искомой нами  $\beta$ -талассемии, явившиеся причиной обращения пациентов в лабораторию самостоятельно, могли привести к изменению анализируемых показателей. Тем не менее этапность исследования и повышение как чувствительности, так и специфичности каждого последующего использованного метода позволили исключить попадание пациентов без искомого состояния в полученную итоговую выборку.

Для всех образцов были рассчитаны 6 эритроцитарных индексов Mentzner, Ehsani, Srivastava, Sirdah, Shine and Lal, England and Fraser [17, 28]. Мы принимаем во внимание, что указанные индексы не являются общепринятым методом скрининга и направлены в первую очередь на дифференциальную диагностику  $\beta$ -талассемии и железодефицитной анемии при наличии гипохромной микроцитарной анемии, что может значительно снижать истинную чувствительность данных индексов в скрининговых исследованиях. Учитывая, что наличие анемии, гипохромии и микроцитоза не являлись критериями включения, в ходе исследования мы говорим о минимально возможной распространенности  $\beta$ -талассемии, осознавая возможность ложноотрицательных результатов индексов.

Учитывая возможную низкую чувствительность и специфичность каждого отдельного индекса, в дальнейшее исследование были включены пациенты с 2 положительными индексами и более, их число составило 38 человек.

На 2-м этапе отобранным пациентам была проведена оценка фракционного состава гемоглобинов методом КЭФ, по результатам которой у 10 из них были выявлены изменения (табл. 2). Учитывая, что отбор по эритроцитарным индексам практически исключает возможность обнаружения качественных гемоглобинопатий, интересной находкой оказалось обнаружение аномального варианта гемоглобина (31,4 % HbC) в отсутствие повышения HbA2 и HbF.

Третий и заключительный этап включал проведение генотипирования гена *HBB* методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру. У 9 из 10 пациентов были выявлены aberrации: у 8 обна-

Таблица 2. Результаты КЭФ гемоглобина у 38 пациентов

Table 2. CE results in 38 patients

| Результат<br>Result                                                   | Число, n<br>Number, n |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Норма<br>Reference                                                    | 28                    |
| Повышение HbA2 (> 3,5 %)<br>HbA2 elevation                            | 7                     |
| Повышение HbF (≥ 2,0 %)<br>HbF elevation                              | 1                     |
| Повышение HbA2 (> 3,5 %) и HbF (≥ 2,0 %)<br>Both HbA2 & HbF elevation | 1                     |
| Аномальный вариант HbC<br>Abnormal Hb variant                         | 1                     |

ружены варианты, характерные для  $\beta$ -талассемии, что составило 0,16 % от общего числа обследованных пациентов, у 1 — aberrация, определяющая HbC-гемоглобинопатию.

Среди пациентов с  $\beta$ -талассемией первым по частоте выявления являлся вариант c.25\_26delAA, остальные aberrации были обнаружены однократно: c.93-21G>A, c.315+1G>A, c.92+6T>C, c.92+5G>A, p.Lys9Arg. Распределение aberrаций указано на рис. 5.

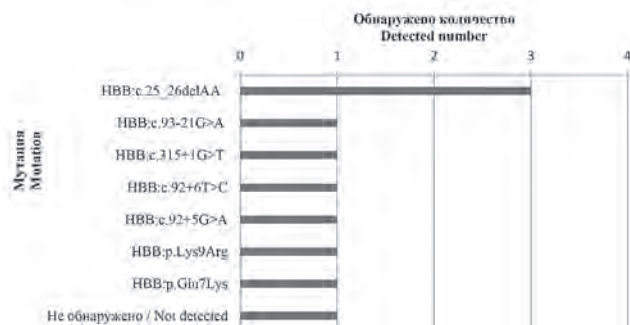


Рис. 5. Результаты секвенирования гена *HBB*

Fig. 5. *HBB* gene sequencing results

По полученным нами данным, минимальная распространенность  $\beta$ -талассемии в исследованной выборке составляет 0,16 %. Мы принимаем во внимание, что пациенты, включенные в исследование, сдавали общий анализ крови по различным неизвестным нам причинам и не являются точным отражением всей популяции РФ. Также требуется уточнить, что использованные индексы не имеют 100 % чувствительности и были разработаны для дифференциальной диагностики железодефицитной анемии и  $\beta$ -талассемии. Необходимо повторно отметить, что в исследование не были включены носители aberrаций без лабораторных симптомов. Для подтверждения полученных данных в будущем планируется значительно расширить группу обследованных.

## Выводы

$\beta$ -талассемия представляет собой одно из самых распространенных наследственных заболеваний и во многих регионах мира ее распространенность недооценена. Она характеризуется генетическим и фенотипическим разнообразием, что делает ее диагностику в ситуациях с легкой и средней степенью тяжести крайне сложной задачей. Классические лабораторные тесты, такие как общий анализ крови, исследование ретикулоцитов, микроскопия мазков периферической крови, не имеют достаточной чувствительности и специфичности для высокоточной диагностики  $\beta$ -талассемии. Методы, связанные с разделением различных фракций нормального и патологического гемоглобинов, характеризуются рядом недостатков, которые часто не позволяют верифицировать диагноз. Молекулярно-генетические методы диагностики являются единственным подходом высокоточного подтверждения  $\beta$ -талассемии любой степени тяжести.



Учитывая гено- и фенотипическое многообразие  $\beta$ -талассемии, верификация диагноза должна проводиться с использованием молекулярно-генетических методик, позволяющих проанализировать все участки гена *HBB*.

Точная распространенность  $\beta$ -талассемии в РФ и в отдельных регионах неизвестна. По полученным

пилотным данным, возможная минимальная распространенность заболевания в Москве составляет 0,16 %. Указанная распространенность является относительно высокой для неэндемичного региона, в связи с чем необходима повышенная настороженность в отношении выявления  $\beta$ -талассемии, в особенности на амбулаторном этапе.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- GBD 2015. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545–602. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
- Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., editors. Disorders of Hemoglobin. Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. doi: 10.1017/CBO9780511596582.
- World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [Электронный ресурс]. URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2022.pdf?sfvrsn=40bfc53a\\_4](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2022.pdf?sfvrsn=40bfc53a_4).
- Fowkes F.J., Allen S.J., Allen A., Alpers M.P., Weatherall D.J., Day K.P. Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. *PLoS Med*. 2008;5(3):e56. doi: 10.1371/journal.pmed.0050056.
- Kountouris P., Kousiappa I., Papasavva T., Christopoulos G., Pavlou E., Petrou M., Feleki X., Karitzis E., Phylactides M., Fanis P., Lederer C.W., Kyrii A.R., Kalogerou E., Makariou C., Ioannou C., Kythreotis L., Hadjilambi G., Andreou N., Pangalou E., Savvidou I., Angastiniotis M., Hadjigavriel M., Sitarou M., Kolnagou A., Kleanthous M., Christou S. The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study. *Sci Rep*. 2016;6:26371. doi: 10.1038/srep26371.
- Kattamis A., Forni G.L., Aydinok Y., Viprakasit V. Changing patterns in the epidemiology of  $\beta$ -thalassaemia. *Eur J Haematol*. 2020;105(6):692–703. doi: 10.1111/ejh.13512.
- Canatan D., Delibas S. Report on ten years' experience of premarital hemoglobinopathy screening at a center in Antalya, Southern Turkey. *Hemoglobin*. 2016;40:273–6. doi: 10.3109/03630269.2016.1170030.
- Lai K., Huang G., Su L., He Y. The prevalence of thalassaemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys. *Sci Rep*. 2017;7(1):920. doi: 10.1038/s41598-017-00967-2.
- Бигаева Л.Ю., Колодей С.В. Первичная диагностика гомозиготной бета-талассемии у больной в возрасте 27 лет. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;4. PMID: 22768720. [Bighayeva L.Yu., Kolodey S.V. The primary diagnostics of homozygotic beta-thalassaemia in female patient aged 27. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2012;4. (In Russ.)].
- Kościełak J. Prevalence of b-thalassaemia minor in Poland. *Probl Hig Epidemiol*. 2009;90(3):322–4.
- Сметанина Н.С., Финогенова Н.А., Лохматова М.Е. Эпидемиология гемоглобинопатий в Москве. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2009;88(4):46–50. [Smetanina N.S., Finogenova N.A., Lokhmatoeva M.E. The hemoglobinopathies epidemiology in Moscow. *Pediatr. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky. 2009;88(4):46–50. (In Russ.)].
- Cappellini M.D., Cohen A., Porter J., editors. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia, 3<sup>rd</sup> edition. Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2014.
- Lee J.S., Cho S.I., Park S.S., Seong M.W. Molecular basis and diagnosis of thalassaemia. *Blood Res*. 2021;56(S1):S39–43. doi: 10.5045/br.2021.2020332.
- Ho P.J., Thein S.L. Gene regulation and deregulation: a  $\beta$  globin perspective. *Blood Reviews*. 2000;14(2):78–93. doi: 10.1054/blre.2000.0128.
- Thein S.L. Molecular basis of  $\beta$  thalassaemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:54–65. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.06.001.
- Anderson S.C., Poulsen K.B., eds. Anderson's Atlas of Hematology. Second edition. Wolters Kluwer Health, 2003.
- Vehapoglu A., Ozgurhan G., Demir A.G., Uzuner S., Nursoy M.A., Turkmen S., Kacan A. Hematological Indices for Differential Diagnosis of Beta Thalassaemia Trait and Iron Deficiency Anemia. *Anemia*. 2014;576738. doi: 10.1155/2014/576738.
- Bain B.J. Haemoglobinopathy Diagnosis [Internet]. Wiley, 2020. doi: 10.1002/9781119579977.
- CDC. Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening , Confirmation and Follow-up. Assoc Public Heal Lab [Internet]. 2015;5–57. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/documents/nbs\\_hemoglobinopathy-testing\\_122015.pdf](https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/documents/nbs_hemoglobinopathy-testing_122015.pdf).
- Ryan K., Bain B.J., Worthington D., James J., Plews D., Mason A., Roper D., Rees D.C., de la Salle B., Streetly A.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: Guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35–49. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x.
- Szuberski J., Oliveira J.L., Hoyer J.D. A comprehensive analysis of hemoglobin variants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Int J Lab Hematol*. 2012;34(6):594–604. doi: 10.1111/j.1751-553X.2012.01440.x.
- Hoyer J.D., Scheidt R.M. Identification of Hemoglobin Variants by HPLC. *Clin Chem*. 2005;51(7):1303–4. doi: 10.1373/clinchem.2005.049577.
- Riou J., Szuberski J., Godart C., Wajcman H., Oliveira J.L., Hoyer J.D., Bardakdjian-Michau J. Precision of CAPILLARYS 2 for the detection of hemoglobin variants based on their migration positions. *Am J Clin Pathol*. 2018;149(2):172–80. doi: 10.1093/ajcp/aqx148.
- Topal Y., Topal H., Ceyhan M.N., Azik F., Çapanoğlu M., Kocabaş C.N. The Prevalence of Hemoglobinopathies in Young Adolescents in the Province of Muğla in Turkey: Results of a Screening Program. *Hemoglobin*. 2015;39(4):247–50. doi: 10.3109/03630269.2015.1046185.
- Li D., Liao C., Li J., Xie X., Huang Y., Zhong H., Wei J. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;128(1–2):81–5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2005.11.016.
- Minaidou A., Tamana S., Stephanou C., Xenophontos M., Harteveld C.L., Bento C., Kleanthous M., Kountouris P. A Novel Tool for the Analysis and Detection of Copy Number Variants Associated with Haemoglobinopathies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15920. doi: 10.3390/ijms232415920.
- Юшкова Н.М., Саллах А. Гемоглобинопатии среди студентов РУДН и наблюдение за взрослым больным из Танзании, страдающим серповидно-клеточной анемией (HbSS). Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2008;4:106–8. [Ushkova N.M., Sallah A. Haemoglobinopathies among students of the Peoples' Friendship University of Russia (PFUR) and observation of a unique case of sickle cell anaemia (patient from Tanzania). *Vestnik RUDN* = Bulletin RUDN. Series: Medicine. 2008;4:106–8. (In Russ.)].
- Demir A., Yarli N., Fisgin T., Duru F., Kara A. Most reliable indices in differentiation between thalassaemia trait and iron deficiency anemia. *Pediatr Int*. 2002;44(6):612–6. doi: 10.1046/j.1442-200x.2002.01636.x.