



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 1 / 2023 г.

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

Генетична диагностика на бета-таласемия в България – какво научихме от нашите пациенти

Силвия Андонова^{1,2}, Ирена Брадинова^{1,2}, Алексей Савов^{1,2}

¹ Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом“, София
² Медицински Университет – София

Резюме

Бета-таласемията е наследствено автозомно-рецесивно състояние. Дължи се на нарушена структура и функция на хемоглобина и има висока честота в района на Средиземноморието, включително и България. Заболяването е добре познато на специалистите, но диагнозата може да бъде предизвикателство при някои пациенти поради широкия спектър на клинична изява и големия брой подлежащи генетични варианти с уникално съчетание между тях.

В настоящото проучване са включени 572 семейства от нашата страна, като майорна β -таласемия е доказана при 195 от индексните пациенти (57 хомозиготи и 138 двуйни/съставни хетерозиготи), а минорна β -таласемия – при 609 изследвани индивиди. Дорогова диагностика е извършена при 107 семейства със 131 изследвани фетуса – от тях 27 са засегнати, 65 са носители и 39 са неносители. Предимплантационна генетична диагностика има при 8 семейства с изследвани 48 ембриони – 11 са определени като засегнати, 24 – са носители и 14 – неносители.

Идентифицирани са общо 35 различни патологични генетични варианти в HBB гена. Най-честите сред тях са IVS1-110, bo39, IVS1-6, IVS2-745, IVS1-1 и Fsh5; открити са и мутации, асоциирани с HbS, Hb Knossos, HbG-Coushatta, HbO-Arabia. Представяме и 4 клинични случая с нетипична клиника или с пропуски в оценката на носителския статус при членове на семействата. Показана е важната роля на генетичното охарактеризиране на мутационния статус в семейството за поставяне на точна диагноза, ефективна профилактика чрез пренатална и предимплантационна диагностика и провеждане на медико-генетична консултация.

Необходими са сравнително малко усилия и предоставянето на системна информация към гражданското общество и здравните специалисти за постигане на оптимален ефект в лечението и профилактиката на това заболяване, особено когато се касае за планиране или проследяване на бременност.

Ключови думи: бета-таласемия, генетика, пренатална и постнатална диагностика

Genetic diagnosis of beta-thalassemia in Bulgaria – what we learned from our patients

Silvia Andonova^{1,2}, Irena Bradinova^{1,2}, Alexey Savov^{1,2}

¹ National Genetic Laboratory, University Hospital of Obstetrics and Gynecology “Maichin Dom”, Sofia
² Medical University of Sofia

Abstract

Beta-thalassemia is an inherited autosomal-recessive condition. It is due to impaired structure and function of hemoglobin and has a higher frequency in the Mediterranean region, including Bulgaria. The disease is well known to clinicians, but diagnosis can be challenging in some patients due to the wide spectrum of clinical presentation and the large number of underlying genetic variants.

In the present study, a total of 572 families for DNA analysis were included. Beta-thalassemia major was diagnosed in 195 of the index patients (57 homozygotes and 138 compound heterozygotes), and beta-thalassemia minor in 609 of the tested individuals. Prenatal diagnosis was performed in 107 families / 131 tested fetuses; 27 were diagnosed as affected, 65 were carriers of one HBB mutation, and 39 were non-carriers. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) was available in 8 families, with 48 embryos tested: 11 were affected, 24 were carriers, and 14 were non-carriers.

A total of 35 different pathological genetic variants in the HBB gene have been identified. The most common among Bulgarians were IVS1-110, bo39, IVS1-6, IVS2-745, IVS1-1, and Fsh5; mutations associated with HbS, HbKnossos, HbG-Coushatta, and HbO-Arabia were also found. Four clinical cases with an atypical clinical presentation or gaps in the assessment of carrier status in family members are also presented. The importance of genetic status characterization for precise diagnosis, effective prevention (by use of prenatal and preimplantation genetic diagnostics), and medical-genetic consultation is demonstrated.

Relatively little efforts and the provision of systematic information to the society and health professionals are needed for achieving an optimal effect in the treatment and prevention of beta-thalassemia, especially when it comes to planning or monitoring pregnancy.

Keywords: beta-thalassemia, genetics, prenatal and postnatal diagnosis

Кореспонденция:

Силвия Андонова, дб
e-mail: sandonova@netscape.net

Correspondence:

Ms. Silvia Andonova, PhD
e-mail: sandonova@netscape.net

Въведение

Бета-таласемията е част от голямата хетерогенна група на хемоглобинопатиите, които са най-честите моногенни състояния в световен мащаб [1]. Разделят се на две големи групи: 1) хемоглобинози (структурни хемоглобинови варианти) – характеризират се със структурни нарушения в глобиновите вериги, дължащи се на генетични варианти, свързани с нарушена функция на тетрамера на хемоглобина; 2) таласемии – дължат се на количествени нарушения в съотношението между алфа и бета глобиновите вериги в хемоглобиновата молекула. Когато количеството на α -веригите е по-малко, се изяснява клиниката на алфа-таласемия, а когато има недостиг на β -вериги – таласемията е от типа бета-таласемия. В зависимост от това дали има напълно липсващ или намален синтез на β -глобинови вериги се различава съответно $\beta\alpha$ и $\beta+$ таласемия [2].

Известно е, че разпространението на таласемията е свързано с устойчивостта към малария [3]. Бета-таласемията е с най-широко разпространение в районите, където маларията е ендемична, т.нар. Thalassaemia belt – „Таласемичния пояс“, който обхваща районите около Средиземноморието (в т.ч. и България), Близкия Изток, Северна Африка, Индия, Югоизточна Азия, Пасифика. Счита се, че около 1.5% от световното население (повече от 80 млн. души) е с носителство на генетични варианти, асоциирани с β -таласемия [4].

Бета-таласемията е асоциирана с мутации в гена *HBB* (OMIM 141900), който кодира β -веригите на хемоглобина. Разположен е на късото рамо на хромозома 11, в района 11p15.4 и е част от т.нар. бета-глобинов клъстер. Този район включва 1 псевдоген (*HBBP1*) и 5 гена (*HBE*, *HBG2*, *HBG1*, *HBD* и *HBB*), кодиращи синтеза съответно на ϵ (епсилон), γ (гама), δ (делта) и β (бета) хемоглобинови веригите. По време на онтогенезата тяхната експресия преминава през две важни превключвания – при прехода първо от ембрион към фетус (от ϵ към γ вериги) и след това след раждането на индивид – от фетален към адултен вид хемоглобин (от γ към δ и β вериги) [1, 5]. Молекулните дефекти при β -таласемията могат да бъдат от различен тип, като основно са единични нуклеотидни замени (точкови мутации) от типа missense, nonsense, splice-site, малки инсерции или делеции, локализиращи в кодиращата част или регулаторните последователности. В резултат могат да бъдат засегнати почти всички етапи от генната експресия на *HBB* гена [6].

Генетичните изследвания при β -таласемията са от съществено значение за клиничната практика и позволяват да се прогнозира тежестта на клиничната изява и възможността за оценка на $\beta\alpha$ / $\beta+$ състоянието в зависимост от откритите конкретни мутации при

съответния пациент [7]. От друга страна, изясняването на генетичния профил при семейство с индексен пробанд позволява извършването на специализирано генетично консултиране, възможност за потвърждаване или отхвърляне на носителство при членове на фамилията, и особено важно – ефективно планиране и извършване на дородова диагностика при бъдещи бременности в това семейство.

Въпреки че заболяването е добре познато на специалистите, диагнозата може да бъде предизвикателство при някои пациенти, както поради широкия спектър на клинична изява, така и поради големия брой подлежащи генетични варианти и уникалното в някои случаи съчетание между тях [1]. В настоящия материал са разгледани няколко клинични случая, които представят проблеми, свързани с генетичната диагноза на бета-таласемията в България.

Материал и методи

Генетичните изследвания за β -таласемия при български пациенти са иницирани от проф. Люба Калайджиева през 80-те години на XX в. в Лаборатория по молекулярна диагностика – днес Национална генетична лаборатория (НГЛ) [8-9]. След това диагностичната дейност е продължена и развита от проф. Иво Кременски и екипа на лабораторията [10], като за периода от 1987 г. до сега са регистрирани над 570 семейства. Пациентите и техните семейства са насочвани за извършване на послеродово и/или дородово изследване от хематолози, генетични консултанти и други клинични специалисти от университетските болници в цялата страна, като основният поток е бил от СБАЛДБ – София, УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“ – София, както и университетските болници във Варна, Пловдив, Стара Загора и други.

Информирано съгласие за извършване на генетични тестове е получено от всички изследвани или техните родители/настойници.

Използваните в настоящото проучване методи за генетичен анализ включват: 1) снемане на анамнеза, 2) изолиране на ДНК от разнообразни биологични материали (венозна кръв с К2ЕДТА, букална лигавица, амниотични клетки, CVS и др.) по метода на изсолване или с търговски набори; 3) полимеразна верижна реакция (PCR) за намножаване на цялата последователност на гена *HBB*, вкл. кодиращите региони и нетранслируемите 5'UTR и 3'UTR и промоторните региони; 4) секвениране по Sanger на амплификационните продукти с търговски набор ABI PRISM BigDye terminator v.3.1. (Applied Biosystems, USA) и последващо анализиране с автоматичен секвенатор ABI3130 (Applied Biosystems, USA), съгласно условията и протоколите на производителя.

Резултати

Съгласно данните от регистъра на НГЛ, в който за

периода 1987 – март 2023 г. са включени 572 семейства, майорна β -таласемия е доказана при 195 от насочените за изследване индексни пациенти (Таблица 1). Сред тях 1/3 са хомозиготи (57/195), а 2/3 са с две различни мутации на *HBB* гена (138/195) – двойни/съставни хетерозиготи. Хетерозиготно носителство на патологичен генетичен вариант в гена *HBB* е установено при 609 изследвани индивиди (β -таласемия минор).

Дородова диагностика е извършена при 107 семейства и са изследвани 131 фетуса. Засегнат плод е диагностициран при 27 от тях, при 65 е открито носителство на патологичен *HBB* генетичен вариант, а 39 фетуса са определени като неносители. Болшинството от инвазивните дородови процедури са извършени от специалисти по акушерство и гинекология в СБАЛАГ „Майчин дом“.

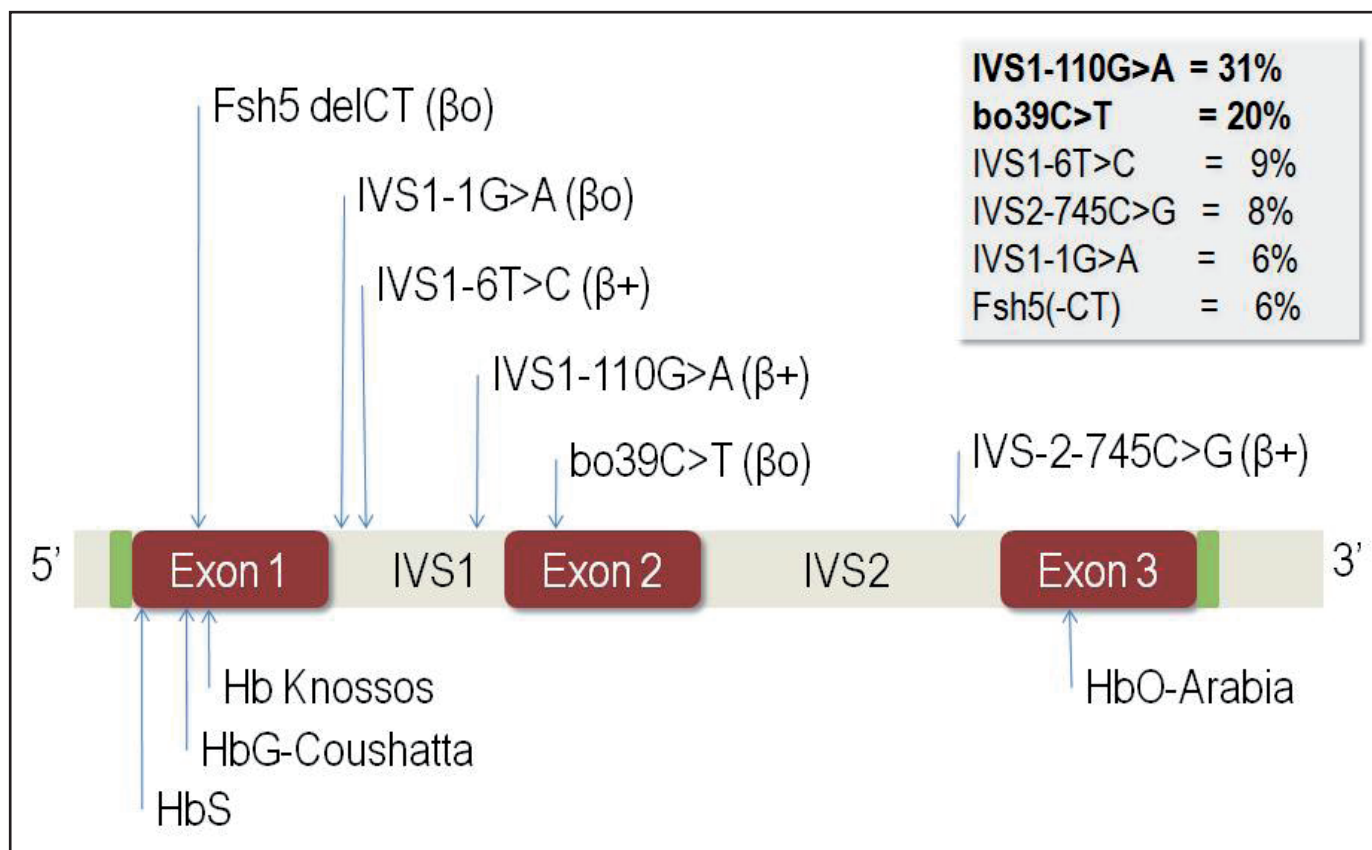
Към предимплантационна диагностика (PGD, preimplantation genetic diagnostics) като превантивна стратегия са се насочили общо 8 от семействата в нашия

регистър, като са изследвани предоставени ДНК проби от 48 ембриона. Сред тях като засегнати и неподходящи за имплантиране бяха диагностицирани 11 ембриона, 24 – като носители и 14 – като неносители на патологичен вариант в *HBB* гена. По всички PGD случаи е работено в тясна колаборация с екипа на МБАЛ „Надежда“.

С анализите, извършени в НГЛ, са идентифицирани общо 35 различни патологични генетични варианта в *HBB* гена. Най-честите сред тях са IVS1-110 (с.93-21G>A) – с изчислена честота 31%, bo39 (с.118C>T) – честота 20%, IVS1-6 (с.92+6T>C) – честота 9%, IVS2-745 (с.316-106C>G) – честота 8%, IVS1-1 (с.92+1G>A) – честота 6%, Fsh5 (с.17_18delCT) – честота 6% (Фиг. 1). Открити са и няколко мутации, асоциирани със структурни хемоглобинови варианти (хемоглобинози) – с.20A>T/p.Glu6Val (HbS, Sickle cell anemia), с.82G>T/p.Ala27Ser (Hb Knossos), с.68A>C/p.Glu22Ala (HbG-Coushatta), с.364G>A/p.Glu121Lys (HbO-Arabia).

Таблица 1. Изследвани за бета-таласемия семейства в Национална генетична лаборатория и извършени анализи

<i>HBB</i> ген / Бета-таласемия	Брой изследвани 1987 – март 2023 г.
Изследвани семейства	572
Постнатално изследвани индивиди	1072
Таласемия майор	195
Хомозиготи	57
Двойни/съставни хетерозиготи	138
Таласемия минор (хетерозиготни носители)	609
Семейства с извършена дородова диагностика	107
Фетуси, изследвани дородово	131
Засегнати фетуси	27
Фетуси – носители	65
Фетуси – неносители	39
Семейства, включени в PGD	8
Ембриони, изследвани с PGD	48
Засегнати ембриони	11
Ембриони-носители	23
Ембриони-неносители	14



Фигура 1. Най-често откриваните патологични генетични варианти, тяхната локализация в HBB гена и честоти в българската популация

Клиничен случай 1

Индексният пациент в семейството (Фиг. 2) е момиченце на 1 година с клинично-лабораторна констелация, суспектна за β -таласемия (HGB 71 g/L, MCV 62.5 fl, MCH 20.9 pg) и необходимост от провеждане на хемотранзфузии. Проведените изследвания на ПКК при родителите показват съответно HGB 120 g/L, MCV 74.0 fl, MCH 23.9 pg (при майката) и HGB 134 g/L, MCV 62.3 fl, MCH 19.6 pg (при бащата). Електрофорезата на хемоглобин при родителите установява съответно HbA = 98.2% и HbA2 = 1.8% при майката и HbA = 95.5% и HbA2 = 4.5% при бащата. По анамнестични данни, в семейството на бащата е известно наличието на анемия в различни поколения, но при това на майката такива данни няма.

С проведения ДНК анализ се откриват два известни генетични варианта в HBB гена, асоциирани с хемоглобинопатии – IVS1-110 (HBB:c.93-21G>A), унаследен от бащата, и HBB:c.82G>T / p.Ala27Ser (HbKnossos), унаследен от майката. По литературни данни носителството на HbKnossos е асимптоматично, както е и при майката на индексния пациент. Комбинираното носителство с мутации, асоциирани с β -таласемия обаче може да има разнообразна клинична презентация [11-12]. Детето подлежи на клинично проследяване и преценка за провеждане на терапия.

Клиничен случай 2

Поради наличие на инфертилитет от женски фактор при второто представяно семейство е предприета асистирана репродукция с използването на донорска яйцеклетка. След имплантиране на два ембриона е постигната двуплодна бременност, завършила с раждане на близнаци от мъжки пол (Фиг. 2). При едното дете (на 1-годишна възраст към момента на насочване към НГЛ) има данни за анемия, суспектна за β -таласемия: HGB 63 g/L, MCV 74.0 fl, MCH 23.5 pg.

Извършеният генетичен анализ при пациента установи носителство на два генетични варианта в HBB гена, асоциирани с β -таласемия: IVS1-1 (HBB:c.92+1G>A) и Fsh6 (HBB:c.20delA). Хетерозиготно носителство на мутацията IVS1-1 е открито както при бащата, така и при другия близък.

Клиничен случай 3

Касае са за семейство с 2 деца – момче и момиче на 2-годишна възраст, родени от двуплодна бременност след асистирана репродукция (Фигура 2). И при двете деца са налице данни за анемия, суспектна за β -таласемия: HGB 92 g/L, MCV 72.3 fl, MCH 23.5 pg, HbA = 4.3%, HbA2 = 2.1%, HbF = 93.6% (при момчето) и HGB 101 g/L, MCV 70.1 fl, MCH 23.1

pg, HbA = 5,0%, HbA2 = 2.2% , HbF = 92.8% (при момичето). Електрофоретичните данни от извършените впоследствие изследвания при родителите показват профил, характерен за хетерозиготна бета-таласемия: HbA = 88.1%, HbA2 = 5.1% и HbF = 6.8% (при майката) и HbA = 93.9%, HbA2 = 4.5% и HbF = 0.5% (при бащата).

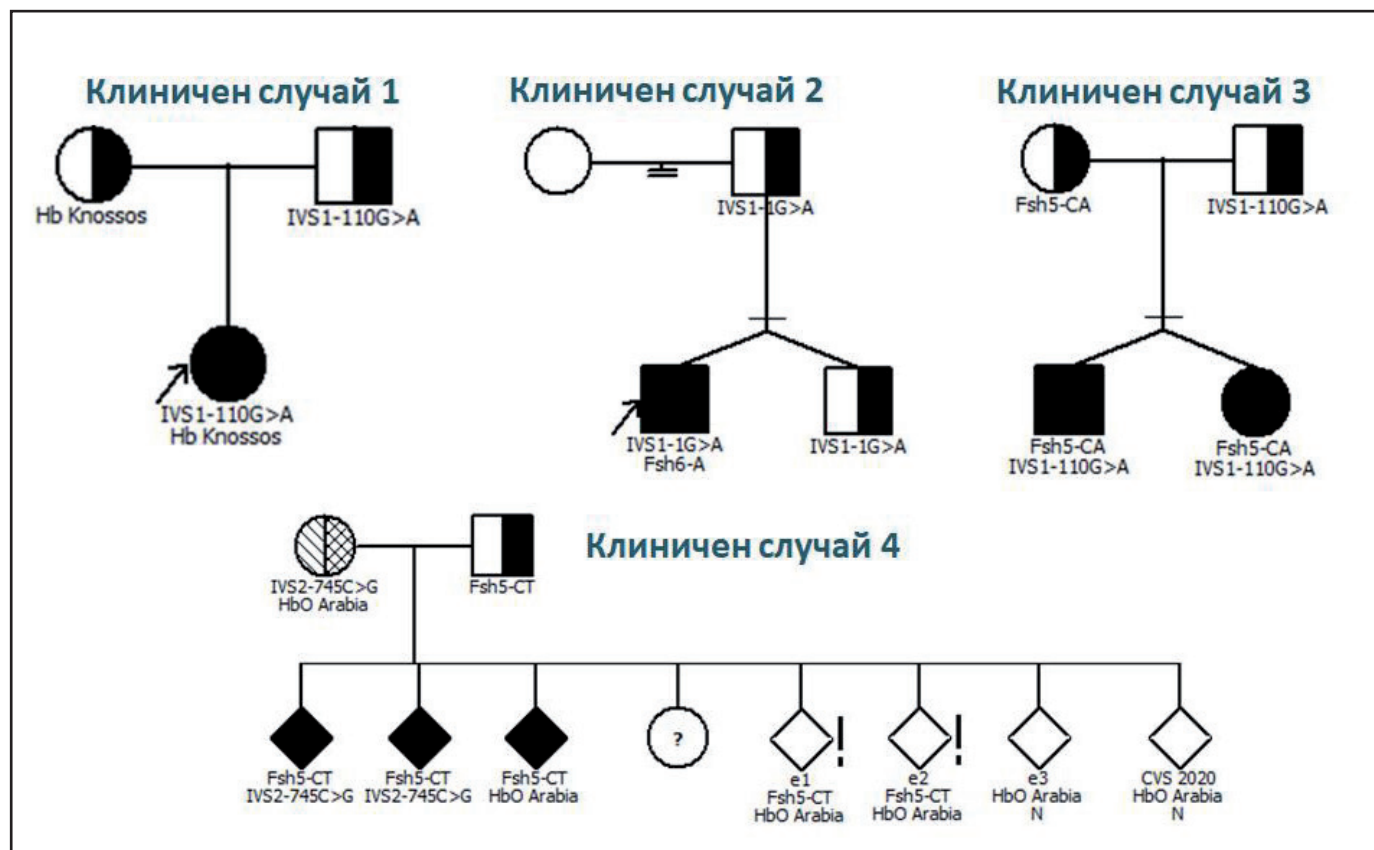
Проведеният ДНК анализ в семейството намери и при двете деца съставно хетерозиготно носителство на два генетични варианта в *HBB*, асоциирани с β -таласемия: Fsh5 (HBB:c.17_18delCT), унаследен от майката, и IVS1-110 (HBB:c.93-21G>A), унаследен от бащата.

Клиничен случай 4

Партньорката от това семейство (Фигура 2) е с анемия от ранна детска възраст, налагаща хемотрансузии. Данните от електрофорезата на хемоглобин показват наличие на хемоглобинов профил с допълнителна фракция, обозначена като HbX и следните резултати: HbA+HbF = 4.3%, HbA2+X = 95.61%, HbF=1.85%. С оглед планиране на бременност е изследван и партньора в двойката, като при него се установяват данни за хетерозиготно носителство на β -таласемия: HbA+HbF = 95.24%, HbA2 = 4.76%, HbF = 0.72%.

Генетичните изследвания показаха съставно хетерозиготно носителство на два известни патологични варианта в гена *HBB* при партньорката – IVS2-745 (HBB:c.316-

106C>G) и c.364G>A / p.Glu121Lys (асоцииран с HbO-Arabia). При партньора се доказва хетерозиготно носителство на делеция на 2 нуклеотида в кодон 5 (мутацията Fsh5, HBB:c.17_18delCT). При проведената генетична консултация на семейството бяха разяснени рисковете за раждане на дете с хемоглобинопатия (50% заради носителството на две мутации в *HBB* гена в транс-позиция при майката) и бяха описани възможностите за извършване на дородов анализ. Трите последователни спонтанно възникнали бременности в семейството бяха прекъснати по медицински показания поради унаследяване на патологичните варианти, асоциирани с β -таласемия от двамата родители (първите две бременности) и майчиния HbO-Arabia вариант в съчетание с бащината мутация (третата бременност). Семейството беше насочено към планиране на асистирана репродукция с включване на предимплантационни генетични изследвания (PGD), които обаче към онзи момент все още не се предлагат от специализираните клиници в България. Няколко години по-късно (когато методът PGD се практикува и в България), вече с родено дете след такава процедура, извършена в чужбина, семейството отново посещава кабинет за генетична консултация. Желанието е за бременност чрез асистирана репродукция и предимплантационна генетична диагностика. От предоставените на НГЛ намножени ДНК проби от 3 ембриона, като подходящ за имплантиране беше определен само един (неносител на бащината мутация). Извършената



Фигура 2. Клинични случаи, представяни в настоящото проучване

Впоследствие пренатална инвазивна процедура при успешно настъпилата бременност потвърди хетерозиготно носителство на HbO-Arabia при плода и беше достигнато го успешно родоразрешение.

Обсъждане

Бета-таласемията е наследствено състояние, дължащо се на нарушена структура и функция на хемоглобина и имащо традиционно висока честота в района на Средиземноморието, Близкия Изток и Южна Азия. Характеризира се с проявява на хронична анемия с различна тежест, изискваща в повечето случаи чести хемотрансфузии и прилагане на терапия с желязо-хелатни агенти [6]. Асоциира се със широк спектър от патологични генетични варианти (мутации) в гена *HBB* с различно географско разпространение, което е свързано с миграциите на човешката популация [2]. Лабораторните методи за анализ и за скриниране на носители включват пълна кръвна картина (ПКК), електрофореза на хемоглобинови фракции и ДНК анализ за определяне на патологичните варианти в *HBB* гена, кодиращ синтеза на β -глобиновите вериги [1].

Бета-таласемията се предава в поколенията по автосомно-рецесивен модел на унаследяване, като рискът в поколението да се предаде носената от майката мутация, в комбинация с тази от бащата е 25% при всяко зачеване (независимо от предходните или предстоящите). Дали пациентът ще бъде хомозигот или двоем/съставен хетерозигот по мутации в *HBB* гена зависи от това дали е унаследил съответно един и същ патологичен генетичен вариант от своите родители, или два различни. Тази информация не може да бъде предоставена от клиничните лабораторни методи като например електрофореза на хемоглобин, а се получава само с помощта на ДНК анализ.

Поставянето на генетична диагноза е от съществено значение за пациента и семейството. Видът на молекулните дефекти в *HBB* гена до голяма степен определя тежестта на клиничната изява и заболяването, затова информацията от генетичните резултати може да служи като важен прогностичен маркер [7]. Допълнително роля в това отношение имат и някои вторични генетични модификатори [1, 4, 6]. На разположение са немалко публично достъпни бази данни с публикувани известни генетични варианти в *HBB*, асоциирани с изявата на таласемия и различни хемоглобинози [13-16]. Информацията, която се публикува, касае номенклатурното описание на варианта, клиничната изява при пациенти с носителство на конкретните варианти, с каква честота се срещат в различните популации и т.н., което би могло да бъде в помощ на клиничните специалисти.

При представения клиничен случай 1 лабораторни данни за таласемия минор има само при единия родител,

докато клиниката на пациента (включително нуждата от хемотрансфузии) не кореспондира с носителски статус. Разкритото с генетичен анализ носителство на HbKnoossos при другия родител не се асоциира с клинична симптоматика и не води до промяна в лабораторните показатели от електрофорезата на хемоглобин, което е в съответствие с докладваното в различни бази данни [11-13]. Провеждането на генетични изследвания при пробанда и родителите е препоръчително във всички случаи на бета-таласемия и особено полезно при пациенти с нетипична клиника. Именно така бяха установени видът и сегрегацията на молекулните дефекти в това семейство и се даде възможност да бъде поставена точна диагноза на пациента.

Генетичното охарактеризиране и определянето на мутационния статус в семейството с ДНК анализ е основен инструмент за ефективна профилактика по отношение на β -таласемия чрез извършването на пренатална, а понастоящем – и предимплантационна диагностика, както и за адекватно проведена медуко-генетична консултация. Клиничният случай 4 представя семейство с висок риск за раждане на дете с хемоглобинопатия, свързан със статуса двоем/съставен хетерозигот от страна на единия родител. Регистрираните последователни 3 патологични бременности са сериозно психологическо натоварване на семейството и възможността да бъде проведена генетична селекция на ембрионите е особено подходящо решение при такива семейства.

Независимо че генетична диагностика на β -таласемия в България се провежда вече повече от 35 години, все още се наблюдават съществени пропуски по отношение на адекватната профилактика с оценка на носителския статус. Клиничните случаи 2 и 3 представят реални пропуски от страна на клиници по асистирана репродукция. Не е бил оценен възможният носителски статус за β -таласемия при партньорите или донорите, което на практика е лесно осъществимо чрез достъпните лабораторни изследвания ПКК и електрофореза на хемоглобини. В случая това е причина да бъде допуснато раждането на деца с таласемия майор. С оглед прилагането на асистиран репродуктивни техники при немалко семейства в комбинация с очакваната висока честотата на носителство на β -таласемия у нас, е добре в алгоритмите на клиниките за асистирана репродукция да залегне и задължителен скрининг за носителство на β -таласемия.

Анализът на данните от поддържания регистър на НГЛ показва и една интересна тенденция – в последните години при насочваните индексни пациенти все по-рядко с ДНК анализ се доказва β -таласемия майор. Тъй като не се наблюдава стабилна тенденция броят на засегнатите от тежката форма на β -таласемия у нас да намалява, то вероятно това

се дължи на недобрата осведоменост за възможностите на ДНК анализа за диагностика на β -таласемия (както при клиничните специалисти, така и сред обществото).

Заклучение

В заключение, смятаме, че са необходими сравнително малко усилия и предоставянето на системна информация към гражданското общество и здравните специалисти за постигане на оптимален ефект в лечението и профилактиката на това заболяване, особено когато се касае за планиране или проследяване на бременност.

Благодарности

Авторите на настоящия материал изказват своята благодарност на семействата и пациентите, както и на проф. г-р Люба Калайджиева, проф. г-р Иво Кременски, доц. г-р Радослава Въжарова, проф. г-р Савина Хаджидекова, г-р Рада Станева.

Библиография

1. Jaing TH, Chang TY, Chen SH, et al. Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Nov 12;100(45):e27522.
2. De Sanctis V, Kattamis C, Canatan D, et al. β -Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017 Feb 20;9(1):e2017018.
3. Angastiniotis M, Cannon L, Antoniou E, et al. Hemoglobin disorders in Europe: a systematic effort of identifying and addressing unmet needs and challenges by the Thalassemia International Federation. *Thalass Rep*. 2021, 11(1), 9803.
4. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 May 21;5:11.
5. Moleirinho A, Seixas S, Lopes AM, et al. Evolutionary constraints in the β -globin cluster: the signature of purifying selection at the δ -globin (HBD) locus and its role in developmental gene regulation. *Genome Biol Evol*. 2013;5(3):559-71.
6. Sanchez-Villalobos M, Blanquer M, Moraleda JM, et al. New Insights Into Pathophysiology of β -Thalassemia. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Apr 12;9:880752.
7. Galanello R, Perseu L, Satta S, et al. Phenotype-Genotype Correlation in β -Thalassemia. *Thalass Rep*. 2011, 1(s2), e6.
8. Kalaydjieva L, Eigel A, Horst J. The molecular basis of beta thalassaemia in Bulgaria. *J Med Genet*. 1989 Oct;26(10):614-8.
9. Huisman TH. Beta-thalassemia in four Mediterranean countries; an editorial commentary. *Hemoglobin*. 1990;14(1):35-9.
10. Kremensky I, Todorova A, Jordanova A, et al. Spectrum of mutations of the most common genetic disorders in Bulgaria, *Journal for Quality of Life Research (J.Q.L.R- E.C. Qua. L.)*. 2003; 1 (2), 172-185.
11. Nasouhipur H, Banihashemi A, Youssefi Kamangar R, et al. Hb Knossos: HBB:c.82G>T Associated with HBB:c.315+1G>A Beta Zero Mutation Causes Thalassemia Intermedia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014 Sep;30(Suppl 1):243-5.
12. Moassas F, Nweder MS, Murad H. Hb Knossos (HBB: c.82G > T), β -globin CD 5 (-CT) (HBB: c.17_18delCT) and δ -globin CD 59 (-) (HBD: c.179delA) mutations in a Syrian patient with β -thalassemia intermedia. *BMC Pediatr*. 2019 Feb 18;19(1):61.
13. Globin Gene Server - <http://globin.bx.psu.edu>
14. The Human Gene Mutation Database - HGMD, <https://www.hgmd.cf.ac.uk/>
15. Varsome - <https://varsome.com/>
16. ClinVar - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>