

INTRODUZIONE

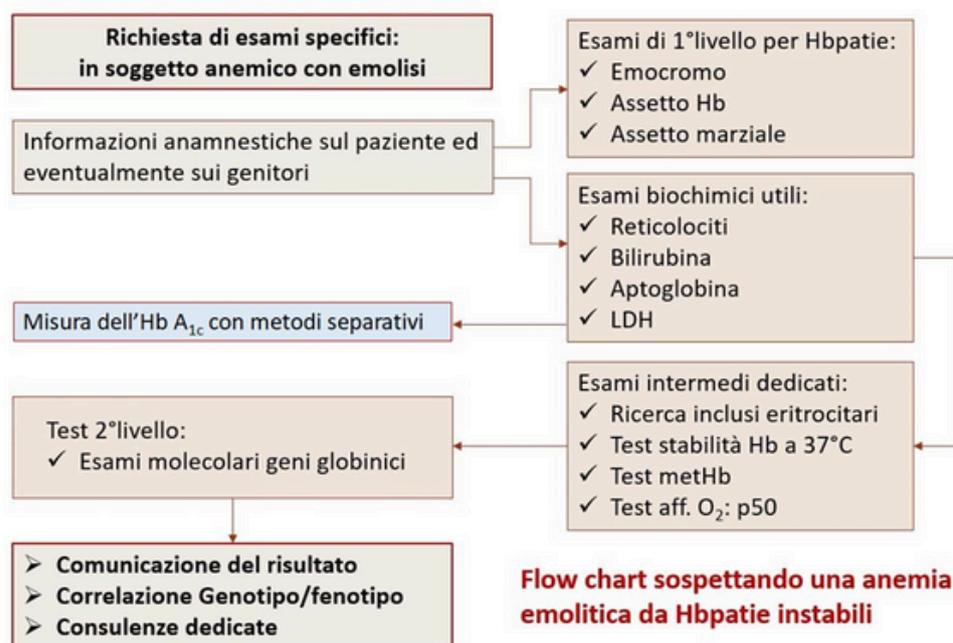
Alcune mutazioni dei geni globinici (sostituzioni, micro-delezioni, inserzioni) possono produrre difetti strutturali caratterizzati dalla sintesi di catene globiniche che non consentono la formazione di tetrameri stabili. Tali difetti sono descritti associati a gradi diversi di instabilità e costituiscono il gruppo delle così dette «varianti instabili dell'emoglobina».

Questi particolari difetti dell'emoglobina (Hb) sono all'origine di processi di denaturazione e precipitazione presentando una ridotta sopravvivenza eritrocitaria. Di conseguenza si potranno avere anemie emolitiche croniche o acute in varie circostanze e forme. Questi fenomeni si osservano normalmente "in vivo" o anche "in vitro" mediante test dedicati. Le Hb instabili esprimono un fenotipo clinico che si trasmette con un meccanismo autosomico dominante che, in alcuni casi come accade per le varianti instabili delle catene beta globiniche, viene assimilato alle talassemie intermedie, particolarmente quando queste varianti Hb vengono co-ereditate con difetti talassemici a formare composti eterozigoti. Le varianti instabili delle catene β ad oggi osservate sono oltre 100, sono difetti rari documentati nella maggior parte dei casi in singoli soggetti (tra cui molti casi de novo), oppure in nuclei familiari isolati. Tuttavia, alcune di queste varianti instabili come l'Hb Köln, l'Hb Genova o l'Hb Zurigo risultano essere più frequenti e presenti in popolazioni diverse.

Le varianti instabili che interessano i geni α (poco più di 40) verranno considerate successivamente. Non si parla di solito di varianti instabili associate ai geni δ per l'assenza di espressioni fenotipiche caratteristiche dovuta alla bassa capacità sintetica del gene δ ; in pratica si può solo classificare instabile un difetto δ partendo dal tipo di sostituzione amminoacidica coinvolta o dalla bassa percentuale di Hb A2-X prodotta. Rari sono i difetti dei geni γ con caratteristiche instabili riscontrate in neonati con ittero. Si può quindi osservare che la maggior parte delle varianti instabili presentano un difetto sulle catene β .

In generale, l'individuazione delle varianti Hb instabili impegna il laboratorio con esami mirati, utili a discriminare tra le possibili diverse cause di emolisi (1-3), esami ancor oggi non sostituibili anche dopo una caratterizzazione molecolare.

Questo «caso 15» vuole porre l'attenzione su tre pazienti che presentano tre varianti instabili delle catene β con caratteristiche diverse. Le tre situazioni qui esposte sono state gestite sulla traccia della flow chart qui riportata utilizzando anche 'homemade methods' ancora oggi non sostituibili e ancora consigliati per dare una veloce ed efficace risposta alle richieste del clinico che può aver osservato e segnalato utili indizi. Nei pazienti qui riportati si è giunti all'analisi molecolare omettendo alcuni esami funzionali ma che potrebbero essere eseguiti successivamente per una migliore gestione della consulenza genetica alla luce del difetto riscontrato.



ASSETTO EMOGLOBINICO

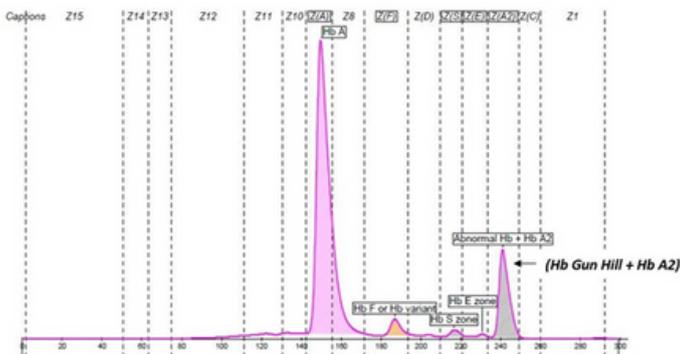
	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Hb A2	n.d.	4,1%	3,8%
Hb F	3,5%	1,5%	Assente
Hb X	17,9% (Hb X + Hb A2)	35,5%	42%*
Hb A1c	18 mmol/mol	n.d.	n.d.

DATI DEL PAZIENTE

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3
Età (sesso)	30 (M)	4 (M)	37 (M)
RBC (10^{12} /L)	5,71	4,23	5,08
HGB (g/L)	139,0 <	118,0	132,0 <
HCT	0,48	0,33 <	0,41
MCV (fL)	84,8	78,5	81,5 <
MCH (pg)	24,3	27,9	26,0
Assetto marziale	Normale	Normale	Normale
Origini	Italia	Italia	Serbia

(*): valore stimato; n.d.: valori non determinati

PAZIENTE 1



L'Hb Gun Hill è una variante delle catene β associata a lieve emolisi compensata. La catena anomala β Gun Hill presenta una delezione di cinque aminoacidi tra i codoni 91 e 95. Ciò comporta una instabilità che si accompagna alla tendenza a formare dimeri che si separano a pH diversi. La delezione comprende l'His prossimale che lega l'eme in posizione 92 che porta ad una affinità alterata per l'O₂ (4).

- L'Hb A2 non è valutabile col programma Hemoglobin(e) ma è determinabile col programma A1c, anche se ininfluente al fine di determinare l'eventuale presenza di β talassemia per i motivi già dimostrati in altri «casi» precedentemente illustrati su questo portale.

- Il paziente non presenta sintomi particolari ma non si possono escludere fenomeni emolitici cronici con ittero e splenomegalia

- La variante presenta una sopravvivenza eritrocitaria ridotta ed è presente in quantità ridotta in circolo. Anche per questo motivo la misura dell'Hb A1c deve considerarsi sottostimata.

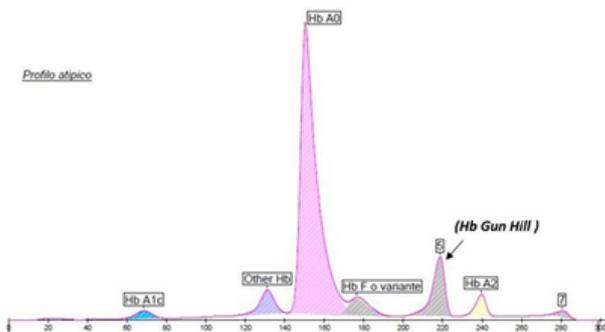
- Il test di stabilità di Carrell è risultato positivo

- Caratterizzazione molecolare:

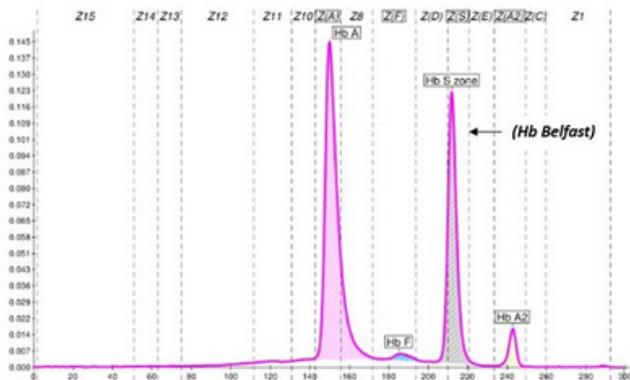
HBB:c.274_288delCTGACTGTGACAAG;

β 91(F7) - 95(FG2) Leu-His-Cys-Asp-Lys- \rightarrow 0

(Hb Gun Hill) eterozigote



PAZIENTE 2



L'Hb Belfast è una variante instabile che si denatura sotto l'azione di sostanze o farmaci ossidanti con crisi emolitiche acute.

E' stata descritta in famiglie di etnie diverse (5).

- L'Hb A2 presenta valori superiori alla norma come accade in diverse varianti instabili delle catene β .

- L'Hb Belfast si presenta in quantità normali per una beta variante con valori ridotti durante le crisi emolitiche che si accompagnano a reticolocitosi, ittero e urine scure.

- L'osservazione della variante in «HbS zone» richiede in primo luogo di eseguire un test di sickling per escludere o confermare l'HbS, in questo caso il test è risultato negativo.

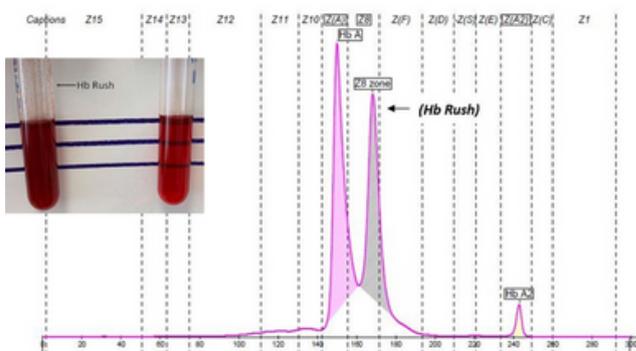
- Il test di stabilità di Carrell è risultato positivo

- Caratterizzazione molecolare:

HBB: c. 46T>A; β 15(A12) Trp>Arg

(Hb Belfast) eterozigote

PAZIENTE 3



L'Hb Rush è una variante leggermente instabile che è stata descritta soprattutto in famiglie Afro-Americane ed Asiatiche. Presenta un fenotipo clinico assimilabile alla talassemia intermedia quando viene ereditata con β talassemia o con Hb E (6).

- Il test di stabilità di Carrell è riportato a sinistra nella foto.

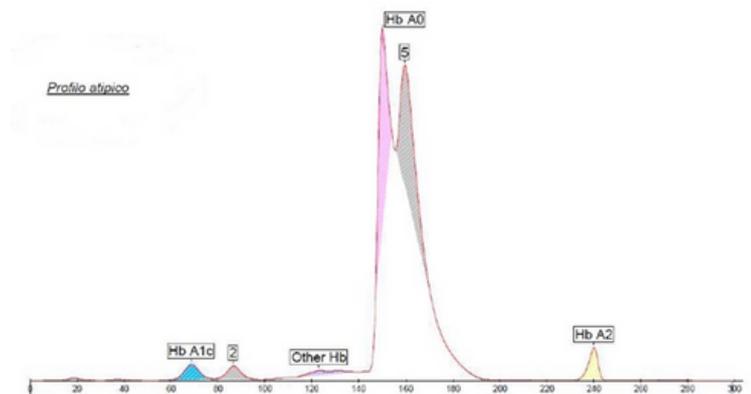
- Anche in questo caso l'Hb A2 risulta aumentata

- Caratterizzazione molecolare:

HBB:c. 304G>C; β 101(G3) Glu>Gln

(Hb Rush) eterozigote

•L'Hb A1c non può essere quantificata per l'interferenza della variante con l'HbA, determinando la sottostima di entrambe le frazioni di riferimento (7).



CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE (1,2,8)

- Una variante instabile delle catene β può causare anemie gravi, moderate o lievi in seguito ad emolisi croniche o acute e ciò dipenderà dalle caratteristiche del difetto.
- Le varianti instabili β possono esordire dopo i sei mesi al termine dello switch dell'Hb F e comunque manifestare segni clinici a tutte le età.
- Le varianti instabili β (8) sono in genere più importanti dal punto di vista clinico rispetto alle varianti a instabili (di cui si parlerà in un successivo "caso").
- Tali varianti non sono tutte rilevabili dai sistemi separativi ed alcune presentano valori di Hb A2 aumentati.
- Alcune varianti instabili vengono definite «iperinstabili» e presentano talvolta un comportamento «talassemico».
- L'associazione con difetti β talassemici o con Hb S o con altre varianti β instabili può produrre forme clinicamente più importanti che talvolta necessitano di trasfusioni o suggeriscono la splenectomia (1).
- In presenza di una anemia emolitica o di una familiarità per una generica condizione emolitica, è particolarmente importante per il laboratorio conoscere i dati anamnestici del paziente.
- Alcuni sintomi ed eventuali esami già eseguiti possono indirettamente suggerire la presenza di una Hbpatia instabile (reticolocitosi, bilirubina indiretta aumentata, aptoglobina assente, LDH aumentato, urine scure).
- Un segnale indiretto della possibile presenza di una variante instabile può giungere anche da valori ridotti dell'Hb A1c a causa della ridotta sopravvivenza eritrocitaria.
- Si osserva che alcune varianti sono leggermente instabili e tale caratteristica si è potuta dimostrare solo mediante test in vitro. Tuttavia, non si può escludere che fenomeni emolitici caratteristici possano verificarsi in vivo quando la variante Hb viene co-ereditata con alcuni difetti non globinici (S. di Gilbert, G6PD, difetti di membrana).
- Queste emoglobinopatie sono rare ma in una popolazione come la nostra, dove la β talassemia è significativamente presente, la prevenzione deve considerare anche il rischio che si formino composti clinicamente rilevanti con tali difetti.
- Se il laboratorio che si occupa del 1° livello diagnostico per le emoglobinopatie non è in grado di gestire metodiche specifiche, anche quelle non molecolari, utili per discriminare inizialmente le condizioni emolitiche, deve comunque interagire con il clinico richiedente l'esame ed essere in grado di collegarsi in tempi brevi con un laboratorio di riferimento.
- L'analisi molecolare è sempre necessaria anche per la caratterizzazione di eventuali altri difetti globinici coinvolti e di eventuali difetti genetici associati che potrebbero contribuire ad aggravare le condizioni cliniche ed orientare quindi in modo corretto la consulenza genetica.

BIBLIOGRAFIA

1. Barberio G, Ivaldi G. Varianti instabili dell'emoglobina: una sfida per il laboratorio? *Biochimica clinica*; 2021.
2. Barberio G, Ivaldi G. (2020). Emoglobinopatie. Dalla diagnosi alle consulenze specialistiche - Padova, Piccin.
3. www.site-italia.org: Diagnostica di I e II livello delle Emoglobinopatie Buone Pratiche SITE, 2022.
4. Rieder RF, Bradley TB Jr. Hemoglobin Gun Hill: an unstable protein associated with chronic hemolysis. *Blood*. 1968;32(3):355-69.
5. Sansone G, Sciaratta GV, Ivaldi G, et al. Hb Belfast (beta 15 Trp replaced by Arg) in an Italian family. *Hemoglobin*. 1982;6(4):391-6.
6. Adams JG 3rd, Winter WP, Tausk K, Heller P. Hemoglobin Rush (beta 101 (g3) glutamine): a new unstable hemoglobin causing mild hemolytic anemia. *Blood*. 1974 Feb;43(2):261-9.
7. Carta M, Barberio G, Meneghini MG, et al. Un utile riscontro occasionale di Variante Emoglobinica. *Biochimica Clinica* 2022; 46(2) e8-e10.
8. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42 (Database issue): D1063-9. www.site-italia.org: Diagnostica di I e II livello delle Emoglobinopatie Buone Pratiche SITE, 2022.