

Varianti instabili dell'emoglobina: una sfida per il Laboratorio?

Giuseppina Barberio¹, Giovanni Ivaldi²

¹UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviso, ULSS2 Marca trevigiana, Treviso

²Già Laboratorio di Genetica Umana, Ospedali Galliera, Genova

ABSTRACT

Unstable hemoglobin variants: a challenge for the laboratory?

The unstable variants represent a subset of rare or very rare defects in the heterogeneous area of hemoglobinopathies; however they constitute a very important group of variants for the related clinical aspects. They exhibit a variety of manifestations that are characterized in many cases by more or less important hemolytic anemias able to attract the attention of clinicians. Actually, the signs produced by the reduced survival of erythrocytes in an adult or often in a child, can have different origins, being the consequence of an alteration of the structure of the erythrocyte membrane, produced by enzymatic or other defects. More than 150 hemoglobin variants, because of their *in vitro* and/or *in vivo* behavior, are generically classified as unstable and can potentially produce hemolytic anemia in various conditions and forms. Generally, a single amino acid substitution can produce an alteration in the primary structure of hemoglobin that promotes the formation of insoluble precipitates within the red blood cells and thus a hemolytic effect. For these particular diseases, the role of the laboratory is essential to differentiate and characterize the causes of the hemolytic anemias. The laboratory contributes to the diagnosis at different levels utilizing continuously evolving methodologies, while maintaining, when necessary, traditional approaches, still essential in solving a number of diagnostic challenges.

Parole chiave: Hb instabili, anemia emolitica, talassemie

INTRODUZIONE

Le varianti instabili rappresentano un gruppo di difetti rari compresi nell'insieme eterogeneo delle emoglobinopatie e ne costituiscono un sottoinsieme importante per gli aspetti clinici che le caratterizzano. Si manifestano con una varietà di fenotipi prodotti dalla ridotta sopravvivenza eritrocitaria e si inseriscono nell'ampio capitolo delle anemie emolitiche. In realtà, le anemie emolitiche, nei soggetti adulti e nei bambini, possono essere prodotte da cause diverse intra- o extra-globulari. Tra le cause intra-globulari di origine genetica ricordiamo i difetti di struttura della membrana eritrocitaria, i difetti enzimatici eritrocitari ed alcune particolari variazioni dell'emoglobina (Hb) (1-3). In pazienti nei quali si sospetta una anemia emolitica raramente la prima causa ipotizzata è quella di un difetto Hb (4) ma, tra le oltre 1 400 varianti Hb fino ad oggi caratterizzate, oltre 150, per il loro

comportamento *in vitro* e/o *in vivo*, vengono classificate genericamente instabili (5,6) e sono, pertanto, potenzialmente all'origine di anemie emolitiche. Alcune di queste varianti instabili si manifestano con una evidente anemia emolitica cronica, mentre in altri casi i segni di emolisi compaiono solo occasionalmente. In genere, a produrre anomalie nella struttura primaria dell'Hb è una singola sostituzione amminoacidica che favorisce la formazione di precipitati insolubili all'interno del globulo rosso, fenomeno che rappresenta la prima causa dell'anemia emolitica. Per capire come la sostituzione o la delezione di un singolo amminoacido possano compromettere un'intera molecola e come poter interpretare o prevedere i variegati effetti di sostituzioni diverse in siti diversi, è necessario osservare nei dettagli la struttura della molecola Hb. Tale struttura ci è stata rivelata dagli studi teorici a partire dagli anni '60 e dalle informazioni che continuiamo ad acquisire con la caratterizzazione di

Corrispondenza a: Giovanni Ivaldi, Via Dell'Alloro 36/13, 16153 Genova, E-mail g.ivaldi@live.it

Ricevuto: 19.11.2021

Revisionato: 15.12.2021

Accettato: 28.12.2021

Pubblicato on-line: 26.01.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.001

nuovi difetti strutturali. Pertanto è opportuno che l'osservazione di una variante Hb, nel corso di esami di 1° livello, sia sempre seguita dalla definizione molecolare del difetto globinico. Riteniamo utile qui richiamare sinteticamente l'attenzione su vecchi concetti basilari che possono aiutare a comprendere e a prevedere meglio i diversi comportamenti *in vivo* e *in vitro* delle varianti Hb, in particolare di quelle instabili.

In Italia sono state osservate diverse varianti α e β instabili, alcune sono riportate nella Figura 1 e tra queste, alcune sono state riscontrate per la prima volta in singoli soggetti o in famiglie di origine italiana (7-9). Per queste particolari patologie, il laboratorio può operare a diversi livelli e con metodologie in continua evoluzione, mantenendo tuttavia, quando necessario, anche approcci tradizionali senza i quali alcuni casi potrebbero apparire vere e proprie sfide diagnostiche.

Emoglobina: interazioni e alterazioni

La struttura della molecola emoglobinica

Ogni molecola di emoglobina è formata da quattro catene polipeptidiche, a due a due uguali fra loro e da quattro gruppi emici legati a ciascuna catena. Nelle prime settimane di vita dell'embrione abbiamo l'Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), l'Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), che compaiono prima del terzo mese di vita intrauterina. Compare quindi l'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) e solo con la fine dello sviluppo fetale e dopo la nascita, si ha la sintesi della frazione minore rappresentata dall'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) che si stabilizza ad una percentuale relativa pari a circa il 3% dopo l'anno di vita. L'HbF scende a valori inferiori all'1% dopo 6-8 mesi dalla nascita. Ciascuna di queste diverse catene è soggetta a variazioni di cui abbiamo evidenza soprattutto con lo studio delle catene β e α mentre in

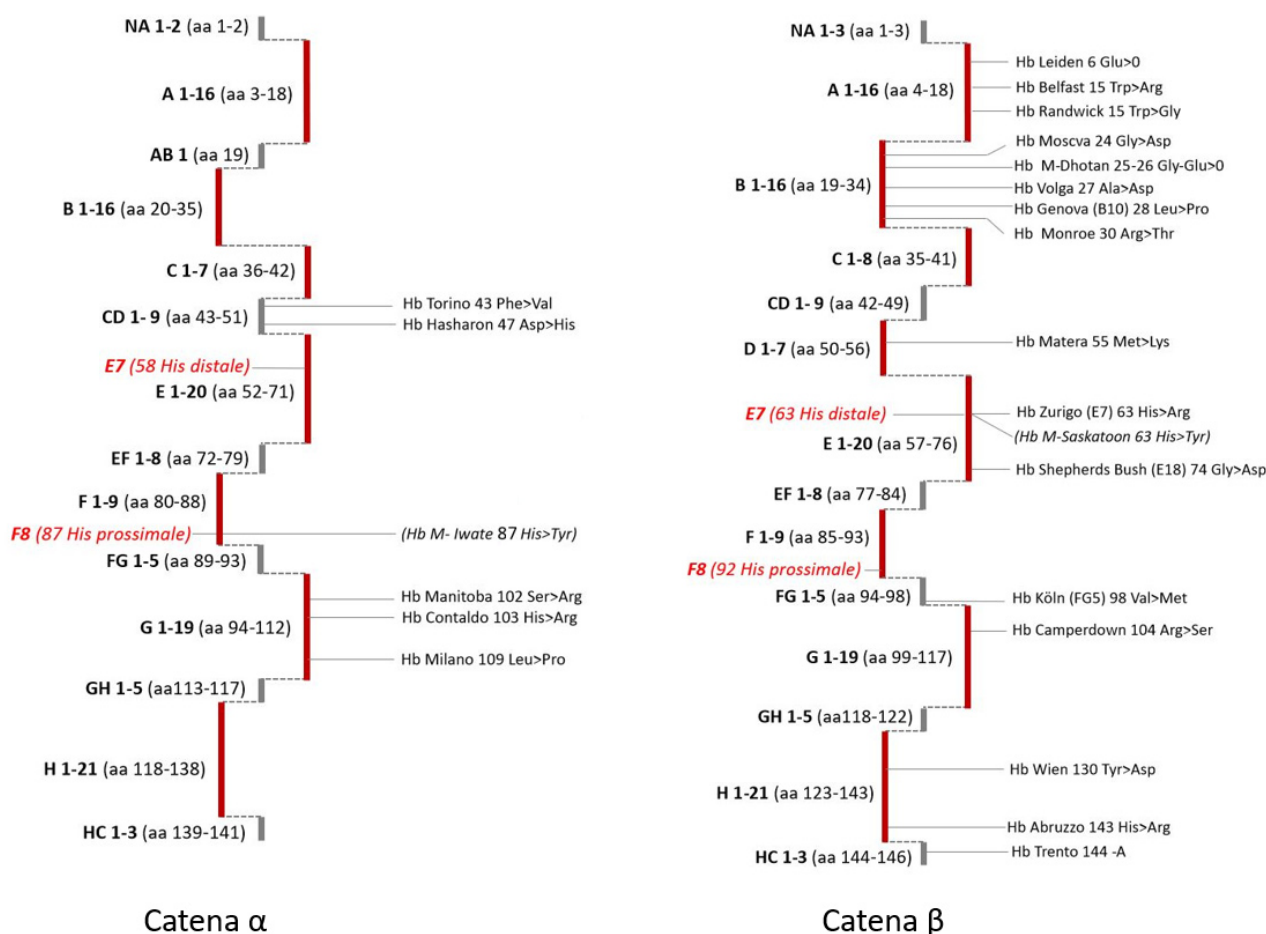


Figura 1

Schema delle catene α e β con evidenziate in rosso le porzioni ad α -elica ed in grigio quelle non ad α -elica. Sono riportate alcune delle varianti instabili caratterizzate nella popolazione italiana.

minor numero sono state descritte sulle catene γ e δ . Esistono differenze nella sequenza e nel numero degli amminoacidi (aa) (141 per le catene α e 146 per β , γ e δ); tuttavia, tutte le catene posseggono una struttura terziaria simile e ogni catena presenta per il 75% una configurazione ad α -elica. Il gruppo carbonilico degli aa forma lo scheletro che si ripiega su sé stesso dando origine ad otto porzioni ad α -elica denominati progressivamente da A ad H che si presentano separati tra loro da cinque segmenti non ad α -elica denominati rispettivamente AB, CD, EF, FG e GH. Ciascuna lettera o coppia di lettere viene contrassegnata con un numero che identifica la posizione del residuo amminoacidico all'interno di ogni tratto elicoidale e non elicoidale. Con questa denominazione, analoghe posizioni strutturali sono indicate nello stesso modo. Ad esempio: con F8 si identificano le istidine (His) prossimali in posizione 92 nelle catene β ed 87 nelle catene α , mentre con E7 vengono indicate le His distali situate rispettivamente in $\alpha 58$ e in $\beta 63$. Una schematizzazione di tale struttura è riportata nella Figura 1. L' α -elica ha una struttura spaziale caratteristica con avvolgimenti regolari e ogni tre o quattro aa si situa uno non-polare. Ciò condiziona la disposizione delle catene laterali di aa non-polari verso l'interno della molecola e il gruppo eme; catene laterali di aa polari sono invece disposte verso la superficie esterna della molecola Hb. Si viene così a creare un ambiente interno che tende a respingere l'acqua mentre gli aa polari o idrofili, rivolti verso la superficie esterna, contribuiscono a mantenere l'Hb in soluzione. La struttura terziaria è rafforzata dai legami idrogeno e dalle forze di Van der Waals tra le catene laterali di aa all'interno dell'elica, tra eliche vicine e tra globina ed eme. Questa architettura è perfettamente in equilibrio stabile, ma ogni minimo cambiamento che riesce ad esporre le parti interne all'acqua (ad esempio, una sostituzione amminoacidica) può contribuire a ridurre la stabilità e ad innescare la denaturazione (10).

I rapporti tra globina ed eme

Come già detto, l'eme nelle catene α e β è circondato da aa non-polari quasi simili. Vi sono 40 punti di interazione fra globina ed eme con il coinvolgimento di 19 aa delle catene α e 21 aa delle catene β . Tutti i legami sono non-polari eccetto quelli tra CD3 ed E10 in β e CD3 in α con gli acidi propionici della porfirina. Vi è poi il legame covalente tra le His in F8 e l'atomo di ferro (Fe) emico (11,12). Il ferro ha sei legami di coordinazione: quattro con gli atomi di azoto dei nuclei pirrolici della protoporfirina, uno con l'His prossimale e quindi uno, mediato dall'ossigeno (O_2), con l'His distale E7. La possibilità che il Fe^{2+} si combini reversibilmente con l' O_2 è soprattutto dovuta alla presenza degli aa non-polari che lo circondano. L'eme nella sua "tasca emica" è importante per stabilizzare la struttura terziaria dell'Hb;

la conformazione ad α -elica viene ridotta di 1/3 quando il gruppo emico è rimosso dalla molecola (13).

I rapporti tra le singole catene polipeptidiche

L'HbA, che rappresenta la quasi totalità dell'emoglobina in un individuo adulto (>96%), è formata da due catene α uguali tra loro e identificate convenzionalmente nel tetramero con α_1 e α_2 e da due catene β altrettanto uguali tra loro e a loro volta identificate con β_1 e β_2 . Per inciso, ricordiamo che le catene α sono sintetizzate in quantità diversa (in un rapporto di 3:1 dai due geni $\alpha 2$ (*HBA2*) e $\alpha 1$ (*HBA1*), ma tutte le catene α prodotte saranno identiche nella composizione aa (14). I contatti tra subunità identiche (α_1 - α_2) e (β_1 e β_2) interessano gli amminoacidi terminali delle catene, mentre quelli tra subunità non identiche sono più numerosi e sono di due tipi: α_1 - β_1 e α_1 - β_2 . Il contatto α_1 - β_1 è assicurato da 34 aa presenti prevalentemente nelle eliche G ed H e nella porzione non ad α -elica GH. Il contatto α_1 - β_1 coinvolge 19 aa situati prevalentemente nelle eliche C e G e nella porzione non ad α -elica FG. Il numero e la disposizione delle catene laterali degli aa sono tali per cui, mentre il contatto α_1 - β_1 consente solo piccoli movimenti, il contatto α_1 - β_2 permette movimenti molto più ampi ed è a questo livello che si hanno i più significativi movimenti tra le singole subunità durante il processo di ossigenazione dell'emoglobina. Occorre inoltre ricordare che il tetramero è in continuo equilibrio con lo stato di dimero e di monomero (15,16).

DIFETTI STRUTTURALI E INSTABILITÀ

Lo studio della struttura dell'Hb ha fatto comprendere come modificazioni delle normali interazioni fra catene laterali degli aa possono provocare instabilità di tutta la molecola. Nella maggior parte dei casi le Hb instabili derivano da mutazioni che interessano: i punti di legame tra eme e globina, i punti di interazione fra le catene polipeptidiche o la conformazione generale dell'Hb.

I punti di contatto con l'eme

Le sostituzioni di aa che presentano punti di contatto con l'eme o che sono situati nella parte interna della molecola presentano alterazioni diverse, sovente sono instabili con fenotipi molto eterogenei e talvolta difficilmente rilevabili dal laboratorio. Nelle Tabelle 1-4 sono elencate le varianti Hb, ad oggi note, che derivano dalle sostituzioni dei 40 residui aa coinvolti nei suddetti contatti (5,6). Osservando gli elenchi delle Tabelle, si comprende come i diversi fenotipi associati ai vari difetti risultino in relazione anche alla natura degli aa sostituenti o sostituiti.

Tabella 1

Varianti delle catene α globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei nove punti di contatto con l'eme fiancheggianti l'His distale [58 (E7)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Rotterdam: $\alpha 32$ (B13) Met>Arg; HBA2:c.98T>G	NO	I/T	?	SI
Hb Amsterdam: $\alpha 32$ (B13) Met>Ile; HBA2:c.99G>A $\alpha 39$ (C4) (d)	NO	I/T	?	SI
Hb Torino: $\alpha 43$ (CE1) Phe>Val; HBA2:c.130T>G	NO	++	↓	NO
Hb Sens: $\alpha 43$ (CE1) Phe>Ile; HBA2:c.130T>A	NO	++	?	NO
Hb Hirosaki: $\alpha 43$ (CE1) Phe>Leu; HBA2:c.132C>G	NO	++	?	NO
Hb Vanvitelli: $\alpha 43$ (CE1) Phe>Leu; HBA1:c.130T>	NO	I/T	↓	NO
Hb Matsudo: $\alpha 45$ (CE3) His>Tyr; HBA1o2:c.136C>T	SI	-	?	NO
Hb Poitiers: $\alpha 45$ (CE3) His>Asp; HBA1o2:c.136C>G	SI	-	↑	NO
Hb Oita: $\alpha 45$ (CE3) His>Pro; HBA2:c.137A>C	SI	-	?	NO
Hb Fort de France: $\alpha 45$ (CE3) His>Arg; HBA1o2:c.137A>G	SI	+	↑	NO
Hb Bari: $\alpha 45$ (CE3) His>Gln; HBA1o2:c.138C>G	NO	-	N	NO
Hb Lake Tapawingo: $\alpha 46$ (CE4) Phe>Ser; HBA2:c.140T>C	SI	+	N	NO
Hb Hillingdon: $\alpha 46$ (CE4) Phe>Val; HBA1:c.139T>G	SI	?	?	NO
Hb Brigante: $\alpha 46$ (CE4) Phe>Ile; HBA2:c.139T>A	NO	?	?	NO
Hb M-Boston: $\alpha 58$ (E7) His>Tyr; HBA2:c.175C>T	SI	-	↓	NO
Hb Boghé: $\alpha 58$ (E7) His>Gln; HBA2:c.177C>A	NO	-	N	NO
Hb Flurlingen: $\alpha 58$ (E7) His>Gln; HBA2:c.177C>G	SI	?	?	NO
Hb Kırklareli: $\alpha 58$ (E7) His>Leu; HBA1:c.176A>T	SI	?	↓	NO
Hb Evans: $\alpha 62$ (E11) Val>Met; HBA2:c.187G>A	NO	++	?	NO
Hb Bishoptown: $\alpha 101$ (G8) Leu>Pro; HBA2:c.305T>C	NO	I/T	?	SI
Hb Utrecht: $\alpha 129$ (H12) Leu>Pro; HBA2:c.389T>C	NO	I/T	?	SI

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro", (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) non sono note varianti.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi.

Instabilità e natura degli amminoacidi

In molti casi, l'instabilità globinica viene prodotta dalla sostituzione di un aa con uno di diverse dimensioni. Un esempio è fornito dall'alanina (Ala) che sostituisce la valina (Val) in posizione E11 nell'Hb Sidney $\beta 67$ (E11) Val→Ala; HBB:c.203T>C (17); l'Ala, avendo dimensioni minori, non riesce a mantenere gli stessi legami che la Val normalmente stabilisce con l'eme. Il contrario si verifica con l'Hb Köln [$\beta 98$ (FG5) Val→Met; HBB:c.295G>A] (18) dove la Val in FG5 è sostituita da una metionina (Met) di dimensioni maggiori. In questi casi le catene laterali degli aa devono essere ripiegate o all'interno o all'esterno con compromissione della stabilità della molecola. Ancora diversi effetti si hanno

con aa diversi che si sostituiscono nella stessa posizione. Un esempio è quello dell'His al codone 63 sulle catene β (E7) quando viene sostituita dall'arginina (Arg); in tal caso si avrà instabilità come accade con l'Hb Zurigo [$\beta 63$ (E7) His→Arg; HBB:c.191A>G] (19,20). Si avrà invece una caratteristica metemoglobinemia quando l'His viene sostituita dalla tirosina (Tyr) nell'HbM Saskatoon [$\beta 63$ (E7) His→Tyr; HBB:c.190C>T] (21). La sostituzione di un aa non-polare con uno polare in una regione idrofoba della molecola può essere altrettanto causa di instabilità, come si ha nell'Hb Riverdale-Bronx [$\beta 24$ (B6) Gly→Arg; HBB:c.73G>C] (22) o nell'Hb Wien [$\beta 130$ (H8) Tyr→Asp; HBB:c.391T>G] (23).

Particolarmente rilevante è l'effetto prodotto sulla

Tabella 2

Varianti delle catene α globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei dieci punti di contatto con l'eme fiancheggianti l'His proximale [87 (F8)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Barika: $\alpha 42(\text{C}7)$ Tyr>His; HBA2:c.127T>C	SI	++	?	NO
Hb Hauteluze: $\alpha 42(\text{C}7)$ Tyr>Cys; HBA2:c. 128A>G	NO	++	?	NO
Hb Huaxi: $\alpha 42(\text{C}7)$ Tyr>Asp; HBA2:c.127T>G	SI	?	?	NO
Hb Erzeroum: $\alpha 42(\text{C}7)$ Tyr>Ser; HBA1:c.128A>C	SI	?	?	NO
Hb Les Andelys: $\alpha 83(\text{F}4)$ Leu>Pro; HBA2:c.251T>C	NO	++	?	NO
Hb Ahvaz: $\alpha 83(\text{F}4)$ Leu>Arg; HBA2:c.251T>G	SI	I/T	?	NO
Hb Ridgewood: $\alpha 86(\text{F}7)$ Leu>Val; HBA2:c.259C>G	SI	++	?	NO
Hb Moabit: $\alpha 86(\text{F}7)$ Leu>Arg; HBA1o2: c.260T>G	SI	++	↓	NO
Hb lwata: $\alpha 87(\text{F}8)$ His>Arg; HBA1o2:c.263A>G	SI	+(d)	↓	NO
Hb M-lwate: $\alpha 87(\text{F}8)$ His>Tyr; HBA1o2:c.262C>T	SI	N(d)	↓	NO
Hb Auckland: $\alpha 87(\text{F}8)$ His>Arg; HBA1o2:c.262C>A	SI	++	N	NO
Hb Port Phillip: $\alpha 91(\text{FG}3)$ Leu>Pro; HBA1o2:c.275T>C	SI	++	?	NO
Hb Kalavassos: $\alpha 91(\text{FG}3)$ Leu>His; HBA2:c.275T>A	SI	?	?	NO
Hb Zara: $\alpha 91(\text{FG}3)$ Leu>Ile; HBA2:c.274C>A	SI	+	?	NO
Hb Treviso: $\alpha 91(\text{FG}3)$ Leu>Phe; HBA2:c.274C>T	SI	+	↓	NO
Hb Bronte: $\alpha 93(\text{FG}5)$ Val>Gly; HBA2:c.281T>G	NO	I/T	?	SI
Hb Die: $\alpha 93(\text{FG}5)$ Val>Ala; HBA1:c.281T>C	NO	++	?	NO
Hb Fuchu-II: $\alpha 97(\text{G}4)$ Asn>His; HBA2:c.292A>C	NO	N	↑	NO
Hb Dallas: $\alpha 97(\text{G}4)$ Asn>Lys; HBA2:c.294C>A $\alpha 98(\text{G}5)$ (e)	SI	N	↑	NO
Hb Caen: $\alpha 132(\text{H}15)$ Val>Gly; HBA2:c.305T>C	SI	++	?	NO
Hb Chicago: $\alpha 136(\text{H}19)$ Leu>Met; HBA2:c.409C>A	SI	N	?	NO
Hb Bibba: $\alpha 136(\text{H}19)$ Leu>Pro; HBA2:c.410T>C	SI	++	?	NO
Hb Toyama: $\alpha 136(\text{H}19)$ Leu>Arg; HBA1o2:c.410T>G	NO	++	?	NO

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro"; (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi e metHb; e) non sono note varianti.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

stabilità di una catena globinica dall'inserimento di un residuo di prolina (Pro): la struttura ad anello di questo amminoacido di solito impedisce la formazione di una normale α -elica, ostacola la formazione della struttura terziaria e, quindi, la stabilità della subunità emoglobinica interessata. Questo accade in modo particolare quando un residuo di Pro sostituisce un residuo dei seguenti amminoacidi: Ala, leucina (Leu), serina (Ser) arginina (Arg) treonina (Thr) o His. Un

esempio per tutti è quello dell'Hb Genova [$\beta 28(\text{B}10)$ Leu→Pro; HBB:c.86T>C] (7). Occorre ancora osservare che l'aa Pro, per la sua struttura, può essere inserito in modo corretto esclusivamente nei segmenti non-elicoideali o nei primi tre siti di un segmento elicoidale; pertanto le varianti che presentano sostituzioni che rispettano tali "regole" non saranno instabili, ma potrebbero avere un'alterata affinità per l'O₂, come si ha nel caso dell'Hb Attleboro [$\alpha 138(\text{H}21)$ Ser→Pro; HBA1 o HBA2:c.415T>C]

Tabella 3

Varianti delle catene β globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche nei dieci punti di contatto con l'eme fiancheggiati l'His distale [63 (E7)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Yokohama: $\beta 31(B13)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.95T>C	NO	++	↓	NO
Hb Hakkari: $\beta 31(B13)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c. 95T>G	NO	++	?	NO
Hb Hazebrouck: $\beta 38(C4)$ Thr>Pro; <i>HBB</i> :c.115A>C	SI	+	↓	NO
Hb Hinwil: $\beta 38(C4)$ Thr>Asn; <i>HBB</i> :c.116C>A	SI	N	↑	NO
Hb Hammersmith: $\beta 42(CD1)$ Phe>Ser; <i>HBB</i> :c.128T>C	NO	++	↓	NO
Hb Louisville: $\beta 42(CD1)$ Phe>Leu; <i>HBB</i> :c.127T>C	NO	++	↓	NO
Hb Sendagi: $\beta 42(CD1)$ Phe>Val; <i>HBB</i> :c.127T>G	NO	++	↓	NO
Hb Mississippi: $\beta 44(CD3)$ Ser>Cys; <i>HBB</i> :c.134C>G	?	+	?	NO
Hb Cheverly: $\beta 45(CD4)$ Phe>Ser; <i>HBB</i> :c.137T>C	NO	++	↓	NO
Hb Arta: $\beta 45(CD4)$ Phe>Cys; <i>HBB</i> :c.137T>G	NO	+	↓	NO
Hb Zürich: $\beta 63(E7)$ His>Arg; <i>HBB</i> :c.191A>G	SI	+	↑	NO
Hb M-Saskatoon: $\beta 63(E7)$ His>Tyr; <i>HBB</i> :c.190C>T	NO	+	N/↑	NO
Hb Bicêtre: $\beta 63(E7)$ His>Pro; <i>HBB</i> :c.191A>C	NO	++	N	NO
Hb Haná: $\beta 63(E7)$ His>Asn; <i>HBB</i> :c.190C>A	SI	++	?	NO
Hb I-Toulouse: $\beta 66(E10)$ Lys>Glu; <i>HBB</i> :c.199A>G	SI	++(d)	N	NO
Hb Chico: $\beta 66(E10)$ Lys>Thr; <i>HBB</i> :c.200A>C	SI	++	↓	NO
Hb M-Milwaukee-I: $\beta 67(E11)$ Val>Glu; <i>HBB</i> :c.203T>A	SI	N(d)	↓	NO
Hb Bristol-Alesha: $\beta 67(E11)$ Val>Met; <i>HBB</i> :c.202G>A	NO	++	?	SI
Hb Sidney: $\beta 67(E11)$ Val>Ala; <i>HBB</i> :c.203T>C	SI	++	?	NO
Hb Manukau: $\beta 67(E11)$ Val>Gly; <i>HBB</i> :c.203T>G	NO	+	?	NO
Hb Christchurch: $\beta 71(E15)$ Phe>Ser; <i>HBB</i> :c.215T>A	NO	N	N	NO
Hb Southampton: $\beta 106(G8)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.320T>C	NO	++	↑	NO
Hb Tübingen: $\beta 106(G8)$ Leu>Gln; <i>HBB</i> :c.320T>A	NO	++	↑	NO
Hb Terre Haute: $\beta 106(G8)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.320T>G	NO	I/T	?	NO
Hb L'Aquila: $\beta 106(G8)$ Leu>Val; <i>HBB</i> :c.319C>G	NO	?	?	SI

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro", (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi e metHb.

I/T, Iperinstabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

(24), o avere un comportamento "normale", come accade con l'Hb Valletta [$\beta 87(F3)$ Thr→Pro; *HBB*:c.262A>C] (25).

Infine, quando è un residuo di Pro ad essere sostituito da Ala o Ser o Arg o Thr o His, difficilmente si

avranno varianti Hb instabili, ma più frequentemente varianti con una affinità aumentata per l'O₂, come nel caso dell'Hb Brigham [$\beta 100(G2)$ Pro→Leu; *HBB*:c.302C>T] (26).

Tabella 4

Varianti delle catene β globiniche che presentano sostituzioni amminoacidiche negli undici punti di contatto con l'eme fiancheggiati l'His prossimale [92 (F8)]

	(a)	Instabilità (b)	Affinità O ₂ (c)	Fenotipo talassemico
Hb Mequon: $\beta 41(C7)$ Phe>Tyr; <i>HBB</i> :c.125T>A	NO	++	N	NO
Hb Denver: $\beta 41(C7)$ Phe>Ser; <i>HBB</i> :c. 125T>C	NO	+	↓	NO
Hb Seattle: $\beta 70(E14)$ Ala>Asp; <i>HBB</i> :c.212C>A	SI	+	↓	NO
Hb Borás: $\beta 88(F4)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.266T>G	SI	+	?	NO
Hb Santa Ana: $\beta 88(F4)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.266T>C	SI	++	?	NO
Hb Sabine: $\beta 91(F7)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.275T>C	SI	++	?	NO
Hb Caribbean: $\beta 91(F7)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.275T>G	SI	+	↓	NO
Hb M-Milwaukee-2: $\beta 92(CF8)$ His>Tyr; <i>HBB</i> :c.277C>T	SI	+(d)	N	NO
Hb J-Altgeld Gardens: $\beta 92(F8)$ His>Asp; <i>HBB</i> :c.277C>G	SI	+	N	NO
Hb Redondo: $\beta 92(F8)$ His>Asn; <i>HBB</i> :c.277C>A	SI	++	N/↑	NO
Hb Mozhaik: $\beta 92(F8)$ His>Arg; <i>HBB</i> :c.278A>G	SI	++	↑	NO
Hb Newcastle: $\beta 92(F8)$ His>Pro; <i>HBB</i> :c.278A>C	SI	++	?	NO
Hb Saint Etienne: $\beta 92(F8)$ His>Gln; <i>HBB</i> :c.279C>G o C>A	SI	++	↑	NO
Hb Regina: $\beta 96(FG3)$ Leu>Val; <i>HBB</i> :c.289C>G	NO	N	↑	NO
Hb Debrousse: $\beta 96(FG3)$ Leu>Pro; <i>HBB</i> :c.290T>C	NO	++	↑	NO
Hb Köln: $\beta 98(FG5)$ Val>Met; <i>HBB</i> :c.295G>A	SI	++	↑	NO
Hb Nottingham: $\beta 98(FG5)$ Val>Gly; <i>HBB</i> :c.296T>G	SI	++	↑	NO
Hb Djelfa: $\beta 98(FG5)$ Val>Ala; <i>HBB</i> :c.296T>C	SI	++	↑	NO
Hb Mainz: $\beta 98(FG5)$ Val>Glu; <i>HBB</i> :c.296T>A	SI	++	?	NO
Hb Richmond: $\beta 102(G4)$ Asn>Lys; <i>HBB</i> :c.309C>A o C>G	SI	N(e)	↑	NO
Hb Kansas: $\beta 102(G4)$ Asn>Thr; <i>HBB</i> :c.308A>C	SI	+	↓	NO
Hb Beth Israel: $\beta 102(G4)$ Asn>Ser; <i>HBB</i> :c.308A>G	SI	+(d)	↓	NO
Hb Saint Mandé: $\beta 102(G4)$ Asn>Tyr; <i>HBB</i> :c.307A>T	SI	N(d)	↓	NO
Hb Heathrow: $\beta 103(G5)$ Phe>Leu; <i>HBB</i> :c.312C>G	NO	N	↑	NO
Hb Saint Nazaire: $\beta 103(G5)$ Phe>Ile; <i>HBB</i> :c.310T>A	NO	N	↑	NO
Hb Allentown: $\beta 137$ GTG>TGG Val>Trp; <i>HBB</i> :c.412_413delinsTG	NO	++	↓	NO
Hb Stara Zagora: $\beta 137-139$ (-TGGCTA) Val-Ala-Asn >Asp; <i>HBB</i> :c.413_418delTGGCTA	NO	I/T	N	SI
Hb Olmsted: $\beta 141(H19)$ Leu>Arg; <i>HBB</i> :c.425T>G	NO	++	?	NO

a) visibilità della variante con i più utilizzati sistemi separativi; b) diversi livelli di instabilità utilizzando il seguente criterio: (+) instabilità solo rilevata in "vitro"; (++) instabilità "in vitro" e "in vivo" con anemia emolitica; c) per diverse varianti l'affinità per l'ossigeno non è documentata; d) dissociazione in dimeri e/o cianosi; e) formazione di ibridi asimmetrici.

I/T, Iper-instabilità/Talassemia con test di instabilità negativi; N, non instabilità.

Altre cause di instabilità e comportamenti caratteristici

Una sostituzione che coinvolge un aa che partecipa al contatto α - β 1 può rendere più debole tale contatto. Occorre infatti ricordare che il tetramero dell'Hb è in continuo equilibrio con lo stato di dimero e di monomero e quindi una sostituzione al contatto α - β 1 può essere in grado di spostare l'equilibrio tetramero \rightarrow dimero verso la forma di monomero, come accade ad esempio con l'Hb Philly: [β 35(C1) Tyr \rightarrow Phe; HBB:c.107A>T] (27).

Lo stesso aa nella stessa posizione e in catene diverse può dare origine a varianti instabili anche quando viene sostituito con aa diversi. Esempi li abbiamo quando un residuo di fenilalanina (Phe) in posizione CD1 nelle catene β viene sostituito per dare l'Hb Hammersmith [β 42(CD1) Phe \rightarrow Ser; HBB:c.128T>C] (28), l'Hb Louisville [β 42(CD1) Phe \rightarrow Leu; HBB:c.127T>C] (29) e in posizione corrispondente delle catene α nell'Hb Torino [α 43(CD1) Phe \rightarrow Val; HBA2:c.130T>G] (8).

Una catena globinica può risultare instabile quando presenta un amminoacido deletato dando così origine a tetrameri instabili, come nel caso dell'Hb Boyle Heights [α 6(A4) Asp \rightarrow 0; HBA1 o HBA2:c.19_21delGAC] (30), dell'Hb Leiden [β 6(A3) Glu \rightarrow 0; HBB:c.22_24delGAG] (31) oppure dell'Hb Freiburg [β 23(B5) Val \rightarrow 0; HBB:c.70_72delGTT] (32).

Quando nel terzo esone dei geni α o β sono presenti microdelezioni nucleotidiche, il segnale di "stop" cambia posizione; in alcuni casi è la stessa tripletta di "stop" ad essere mutata. Quando tali cambiamenti si verificano, le catene globiniche che riescono ad essere sintetizzate avranno un numero variabilmente maggiore di amminoacidi (oltre 146 per le catene β) e la loro lunghezza dipenderà dalla posizione e dal tipo di mutazione nel gene. I successivi tetrameri che potranno formarsi con queste catene anomale saranno instabili. Un esempio è quello dell'Hb Trento [β 144 (-A); HBB:c.434delA] (9) che presenta anche un'alterata affinità per l'O₂. In altri casi, varianti β iper-instabili si associano invece a fenotipi apparentemente talassemici; le catene mutate subiscono infatti una proteolisi così rapida, precipitando subito dopo la sintesi, da non essere in grado di formare un tetramero emoglobinico. Pertanto, in questi casi, i difetti globinici non sono rilevabili con i metodi separativi quali-quantitativi normalmente utilizzati, ma possono produrre incrementi dell'HbA₂, mentre i test utilizzati per determinarne l'instabilità *in vitro* (33) saranno, nella maggior parte dei casi, negativi. Tali β varianti iper-instabili possono contribuire a produrre quadri clinici complessi, simil- β -talassemici, non-trasfusione-dipendenti (NTDT) o, in casi più rari, anche trasfusione-dipendenti (TDT). Un esempio di comportamento intermedio con necessità di sporadiche trasfusioni è quello fornito dall'Hb Brescia (Hb Durham-NC) [β 114(G16) Leu \rightarrow Pro; HBB:c.344T>C], descritta in associazione al triplo gene α (34).

Sono noti anche diversi casi di catene α allungate;

queste si associano a quadri definiti iper-instabili, con una sintesi ridotta o assente di catene globiniche che comunque, se prodotte in minima quantità, risultano instabili e non in grado di formare tetrameri funzionanti. Si avranno fenotipi talassemici particolarmente marcati quando le varianti iper-instabili vengono co-ereditate con difetti α talassemici classici. Tra queste varianti vi sono: l'Hb Constant Spring [142, Stop \rightarrow Gln; HBA2:c.427T>C] (35) riscontrata in diverse popolazioni anche associata ad α talassemia in soggetti con HbH, l'Hb Koya Dora [α 142 Stop \rightarrow Ser; HBA2:c.428A>C] (36) e l'Hb Quong Sze [α 125(H8) Leu \rightarrow Pro; HBA2:c.377T>C] (37) presente soprattutto in popolazioni asiatiche dove sono prevalenti le α talassemie da due geni deleti.

Può essere interessante osservare ancora che studi relativamente recenti hanno permesso di considerare che la stabilizzazione delle catene α globiniche può essere favorita da una proteina prodotta a livello dei precursori eritroidi, l'Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP). Questa proteina forma un complesso con le catene α globiniche che impedisce l'ossidazione e la precipitazione all'interno dei precursori eritrocitari del midollo osseo e che previene l'apoptosi e l'anomala eritropoiesi. Ciò è stato dimostrato inizialmente nei casi di talassemia major (38,39). Successivamente, sono state osservate diverse varianti α globiniche con sostituzione aa in posizioni prossime all'area di contatto tra catene α e AHSP che causano instabilità e comportamenti simil-talassemici. Ciò ha contribuito a dimostrare che l'azione stabilizzatrice dell'AHSP poteva essere ridotta o annullata in particolari circostanze (40,41).

Altre catene globiniche instabili

Abbiamo considerato fin qui i meccanismi fisiopatologici che caratterizzano gran parte dei fenotipi associati alle varianti instabili delle catene α e β globiniche, varianti che costituiscono la quasi totalità dei difetti Hb "instabili" riportati nei database (5,6). Pochissimi sono invece i casi segnalati che riguardano comportamenti "instabili" delle catene δ e γ . Tutte le catene non- α sono tra loro strutturalmente simili poiché presentano notevoli omologie e analoghe cause di instabilità, ma per motivi diversi, i fenotipi prodotti dalle anomalie delle catene δ e γ risultano meno noti o rilevanti. Poiché le catene δ , che costituiscono l'HbA₂, sono correttamente valutabili solo dopo il primo anno di vita e la loro capacità sintetica è di circa 30 volte inferiore a quella delle catene β , si comprende come sia scarsa o nulla l'incidenza che le varianti delle catene δ hanno sull'emoglobina circolante, sui parametri eritrocitari e, quindi, sui vari esami di laboratorio eventualmente utilizzati per determinarne l'instabilità *in vitro*. Pertanto solo una ridotta quantità di HbA₂ rilevata dai sistemi separativi, unita all'assenza o a una minima presenza di frazione anomala (HbA₂-X), può segnalare un difetto di sintesi o l'instabilità delle catene δ . Come già detto in precedenza, tale osservazione o caratterizzazione è

ininfluente per quanto riguarda gli effetti sul fenotipo clinico atteso, mentre la conferma di una variazione del gene δ può essere importante per la corretta valutazione dell'HbA₂ totale nell'ambito della prevenzione per la β talassemia (42,43).

Le varianti delle catene γ , impegnate a formare il tetramero $\alpha_2\gamma_2$, si possono invece osservare quando l'HbF è presente in quantità rilevante; nella norma ciò accade prevalentemente nel neonato poiché presenta un'Hb Fetale attorno al 70-80%. L'HbF è prodotta in diversa quantità dai due geni *HBG1* e *HBG2*, con un rapporto relativo tra le catene prodotte G γ /A γ , pari a circa 7:3 alla nascita e circa 2:3 nell'adulto, quando l'HbF continua ad essere sintetizzata per cause diverse. Si avrà pertanto una quantità diversa di catene γ anomale nel caso in cui una mutazione interessi l'uno o l'altro gene. Lo switch fisiologico dell'HbF, entro 4-8 mesi dalla nascita, porterà alla sostituzione con l'HbA e quindi alla scomparsa dell'anemia quando prodotta da una mutazione dei geni γ . Non essendo normalmente previsto l'esame dell'assetto Hb alla nascita per tutti i nati, se non in particolari situazioni di screening mirato all'HbS, osservare una variante dell'HbF in un neonato potrà accadere solo se nel lasso di tempo di 4-8 mesi dalla nascita si verificano condizioni di ittero persistente o anemia marcata o valori elevati di metaemoglobina (metHb) (44-47) che possono suggerire l'esame dell'assetto Hb.

Varianti instabili e affinità per l'ossigeno

La maggior parte delle Hb instabili presenta un'alterata affinità per l'O₂ in seguito ai cambiamenti intervenuti nella struttura dell'Hb e nei rapporti modificati con gli effettori allosterici, in primo luogo con il 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (48). Esempi di varianti con affinità diminuita sono: l'Hb Torino, l'Hb Hammersmith, l'Hb Seattle (8,28,49); quelli di varianti con affinità aumentata sono: l'Hb Köln, l'Hb Zurigo, l'Hb Freiburg, l'Hb Shepherd's Bush (50-52). L'andamento della curva di dissociazione dell'ossi-Hb dipende dalla conformazione della globina nella sua parte che circonda il gruppo eme, dipende anche dagli aa che intervengono nell'effetto Bohr e da quelli che legano il 2,3-DPG. Questi aa sono quelli che più frequentemente vengono coinvolti nelle sostituzioni che portano all'instabilità dell'Hb. Le varianti Hb con affinità aumentata non instabili mostrano eritrocitosi (53) ed ematocrito elevato, tale comportamento è meno evidente quando le varianti sono anche instabili (54,55). Le varianti instabili con affinità diminuita potranno associarsi a cianosi che sarà più marcata con varianti β , meno con varianti α ; di solito tale fenomeno è in relazione alla quantità di variante circolante che per le varianti α potrà dipendere dalla loro eventuale associazione con difetti α -talassemici (56). In letteratura è descritto che i soggetti portatori di varianti con bassa affinità o anemia marcata possono presentare una bassa saturazione dell'ossigeno e quindi intervalli sensibilmente diminuiti, inferiori a 89% (57-59).

Varianti instabili omozigoti o in associazione con difetti talassemici

Come detto più sopra, le varianti Hb instabili sono molto rare e si trasmettono con caratteristiche dominanti. Bastano queste due considerazioni per comprendere come possa essere poco probabile riscontrare tali varianti allo stato omozigote. Un raro caso riportato in letteratura (60) è quello di una ragazza di 13 anni (figlia di cugini di primo grado) con Hb Bushwick: [β 74(E18) Gly→Val; *HBB*:c.224G>T] allo stato omozigote, tale variante allo stato eterozigote può essere considerata di tipo 2 (Tabella 5), instabile *in vitro* e *in vivo*, ma senza segni emolitici rilevanti, mentre allo stato omozigote produce una grave anemia emolitica che richiede sporadiche trasfusioni (60). Più frequenti sono i casi di composti eterozigoti tra variante instabile e difetto β -talassemico che manifestano situazioni molto eterogenee e che dipendono dal tipo di instabilità della variante coinvolta (Tabella 5) e dal tipo di difetto talassemico (β^0 , β^+ , β^{**}) (61-64). Analogamente accade con le α varianti instabili co-ereditate con le α talassemie (65). Verosimilmente si può ipotizzare una maggior gravità e la necessità di trasfusioni regolari o incompatibilità con la vita quando si dovessero presentare varianti β particolarmente instabili allo stato omozigote (Tabella 5: tipi 0 o 1 o 2) o in composti con β talassemia.

Dalle evidenze prodotte da β talassemie allo stato omozigote (NTDT, ma associate a modificatori migliorativi delle espressioni fenotipiche), è possibile che la co-ereditarietà di persistenza ereditaria di HbF (HPFH) e di difetti α talassemici (riducendo entrambe lo squilibrio tra le catene α e non- α) contribuisca, anche nel caso delle β varianti instabili, a ridurre l'anemia e, quindi, a migliorare le condizioni cliniche generali.

Instabilità di particolari emoglobinopatie

Instabilità dell'HbE

L'HbE [β 26(B8) Glu→Lys *HBB*:c.79G>A] allo stato eterozigote è assolutamente asintomatica e non comporta alcun problema di anemia emolitica. Tuttavia l'HbE, la variante più diffusa al mondo dopo l'HbS, merita un cenno in quanto viene talvolta riportata come variante instabile nei casi in cui se ne osserva il comportamento *in vitro* con agenti ossidanti (66) o in soggetti con febbre elevata da varie cause, soprattutto in concomitanza con numerose malattie infettive (67). È stato anche dimostrato che l'HbE viene sintetizzata a una velocità leggermente ridotta in quanto tale mutazione determina nel gene un sito di giunzione criptico che causa una trascrizione anomala dell'RNA messaggero (68). Per meglio comprendere questo meccanismo, occorre tener conto che il normale sito di "splicing" deve competere con questo nuovo sito di giunzione criptico e ne deriva che il livello risultante di RNA messaggero β -E sarà ridotto (69). Viene così a determinarsi un fenotipo equiparabile ad una forma lieve di β talassemia. Si

Tabella 5

Caratteristiche delle varianti emoglobiniche instabili in relazione alla causa che ha determinato l'instabilità, alla presentazione clinica, alla diagnosi, e confronto con i classici difetti talassemici

Tipo	Causa	Anemia	Test di instabilità	Fenotipo clinico
1	La catena polipeptidica è così instabile che si denatura subito dopo la sintesi (iperinstabile)	Anemia lieve	Negativi	Comportamento talassemico intermedio-marcato quando la variante è associata a talassemie
2	La catena polipeptidica si forma ma viene nel tempo costantemente distrutta e quindi risulta in quantità ridotta	Anemia emolitica cronica (sopravvivenza eritrocitaria molto ridotta)	Positivi (+++)	Possono rendersi necessarie sporadiche trasfusioni anche allo stato eterozigote
3	La variante Hb si forma ed è stabile ma si denatura solo in seguito a stress ossidativi o febbre elevata	Emolisi acuta con anemia durante gli episodi emolitici	Positivi (++)	Di solito non necessarie trasfusioni, fenotipo intermedio-marcato quando la variante è associata a talassemie
4	La variante Hb si forma in quantità normale o leggermente ridotta. Lieve denaturazione con sostanze ossidanti	Anemia lieve o assente	Positivi (+)	Normale. Fenotipo intermedio-lieve quando la variante è associata a talassemie
0	Il gene globinico non consente la sintesi parziale o totale della catena polipeptidica	Anemia lieve, non significativa in eterozigosi	Negativi	Trasfusioni non necessarie allo stato eterozigote. In composti eterozigoti: NTDT o TDT

NTDT, *Talassemie Non-Trasfusione-Dipendenti*; TDT, *Talassemie-Trasfusione-Dipendenti*.

comprende pertanto come la quantità relativa di HbE così prodotta (25-30% allo stato eterozigote), inferiore ai valori che si osservano nelle varianti β -globiniche, non dipende tanto dalla sua denaturazione o lieve instabilità, quanto dalla sintesi diminuita che le conferisce un comportamento simil-tallemico. Ciò si evidenzia particolarmente nei quadri clinici prodotti dai composti eterozigoti con i difetti talassemici β^0 o β^+ (70,71).

Instabilità dell'Hb Hasharon

La variante Hb Hasharon [α 47(CE5) Asp \rightarrow His; HBA2:c.142G>C] è stata inizialmente descritta in famiglie di ebrei ashkenaziti, per la prima volta nel 1967 in Israele (72,73), poi in Lituania e anche negli Stati Uniti (74). In Italia è stata descritta per la prima volta nel 1975 nel Polesine (province di Rovigo e Ferrara) dove ne è stata accertata una prevalenza pari a circa lo 0,8% della popolazione (75). Tale significativo riscontro sembra dovuto alle molte famiglie di ebrei provenienti dall'Europa del Nord-Est che si insediarono proprio nel Delta del Po attorno al XV secolo (74). Nella maggior parte dei casi l'Hb Hasharon è stata associata ad una lieve anemia emolitica dovuta ad una instabilità della molecola Hb, moderatamente termolabile, e sensibile a sostanze ossidanti (76,77). Un aspetto invece controverso è sempre apparso quello relativo alla quantità di variante rilevata nei numerosi casi studiati nel tempo nelle varie popolazioni. I primi casi riportavano percentuali inferiori al 20%, mentre i successivi studi effettuati in Italia hanno sovente riscontrato la variante in quantità superiore al 25-30%, ovviamente quando essa non era associata a β talassemia. È stato quindi dapprima ipotizzato che la diversa percentuale potesse

dipendere dal tipo di gene α mutato, HBA1 o HBA2; in un secondo tempo è stato dimostrato infatti che l'Hb Hasharon, nei soggetti studiati nel Delta del Po, era conseguente ad una mutazione del gene HBA2 che, come è noto, esprime una sintesi maggiore di catene α (78). Inoltre la variante veniva trasmessa "in cis" con l' α -talassemia -3,7kb (79,80), caratteristica che contribuisce a sua volta ad incrementare la quantità relativa di Hb Hasharon. Pertanto la variante, in base alla sua lieve instabilità e alle sue caratteristiche emolitiche, può essere inserita nel gruppo 4 di Tabella 5, leggermente instabile; essa esprime caratteristiche emolitiche più evidenti quando è associata ad α talassemia con almeno due geni non funzionanti. Quest'ultima caratteristica è stata osservata in un neonato prematuro che presentava l'HbF^{Hasharon} associata ad un fenotipo particolarmente marcato, in quantità prossima al 50%. L'importante anemia emolitica descritta in tale neonato si è risolta solamente dopo lo switch dell'HbF dimostrando che il tetramero $\gamma_2\alpha_2^{\text{Hasharon}}$ risulta particolarmente instabile (81).

Instabilità dell'HbH

Nel caso dell'HbH (β_4) siamo invece di fronte ad un tetramero particolare che si forma dall'eccesso di catene β nelle cellule eritroidi, in presenza di α talassemia con tre geni non funzionanti. La sindrome che si produce viene definita emoglobinosi H ed esprime un fenotipo ematologico e clinico molto simile alle forme di Talassemia Intermedia e, per questo, oggi classificata tra le condizioni NTDT, con fenotipi clinici più marcati quando sono coinvolti difetti α da non-delezione (65). L'HbH si evidenzia normalmente con i diversi metodi

separativi in quantità variabile, in relazione ai difetti talassemici che producono l' α talassemia e all'invecchiamento del campione in esame. Tuttavia, la marcata instabilità dell'HbH fa sì che si osservino caratteristiche proprie delle emoglobine instabili: si degrada facilmente ed in ambiente ossidante precipita a formare le tipiche inclusioni eritrocitarie con danno ossidativo alle membrane delle cellule eritroidi. I portatori di questa particolare Hb possono quindi sviluppare episodi acuti di anemia emolitica in presenza di infezioni, esposizione a farmaci o a sostanze ossidanti e presentano frequentemente splenomegalia con fenotipi variabilmente marcati, anche questo è in relazione ai difetti dei geni α coinvolti. L'HbH mostra inoltre un'affinità molto elevata per l'ossigeno ed una cooperatività assente, per cui non risulta fisiologicamente utilizzabile per trasportare o cedere l'O₂ (82-84).

Varianti instabili ed emoglobina glicata

L'utilizzo dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) per la diagnosi e il monitoraggio del diabete mellito richiede di porre attenzione ad alcuni fattori essenziali, nell'ottica di una buona concordanza tra i valori di glicazione e le concentrazioni di glucosio nel sangue (85). Tra le cause che possono modificare il valore dell'HbA_{1c} vi è la ridotta sopravvivenza eritrocitaria. L'età media degli eritrociti nei pazienti che presentano anemia emolitica, con perdita di sangue acuta o cronica, risulta sensibilmente più bassa e ciò, come in precedenza detto, si esprime in modi e gradi diversi nei portatori di varianti instabili dell'Hb. Se tale condizione non è nota, gli esami di laboratorio possono indicare valori di HbA_{1c} sottostimati e indurre conseguentemente in errore la diagnosi e la valutazione conclusiva di una eventuale condizione diabetica (86-88). Occorre anche considerare che, nell'ambito della ricerca della condizione diabetica, valori particolarmente ridotti dell'HbA_{1c} possono essere indicatori di una condizione di diminuita sopravvivenza eritrocitaria e/o di uno stato emolitico non osservato in precedenza (89).

Varianti instabili ed ereditarietà

La maggior parte dei difetti talassemici e strutturali dell'Hb è caratterizzata da alterazioni ereditarie che si trasmettono secondo modalità autosomica recessiva e che sono clinicamente asintomatiche allo stato eterozigote. Esistono alcune eccezioni rappresentate da difetti rari associati ad instabilità della struttura tetramericca dell'Hb, a fenomeni emolitici più o meno marcati e a fenotipi altrettanto importanti. Ciò accade con molte varianti instabili che presentano un modello di ereditarietà autosomica dominante (90). Sono soprattutto le varianti delle catene β globiniche a presentarsi con questa modalità anche allo stato eterozigote, mentre alle varianti instabili delle catene α occorre l'associazione con difetti α talassemici per manifestare fenotipi clinici importanti (65). È stato anche osservato che le varianti instabili presentano una frequenza più elevata di mutazioni *de novo*, soprattutto delle catene β (91). In letteratura esistono diversi casi di

individui con difetti Hb i cui genitori non manifestano o, comunque, non presentano tali difetti nel loro corredo genetico. Tali situazioni possono avere origine da mosaici genetici (eventi "nuovi" che si verificano per la prima volta in un soggetto). In letteratura sono riportati inoltre casi *de novo* prodotti da errate interpretazioni, soprattutto situazioni nelle quali non sono state eseguite le indagini genetiche appropriate sui familiari a supporto delle conclusioni (92-94).

Altri aspetti associati alle varianti Hb instabili

Fattori esogeni causativi di fenomeni emolitici

L'emolisi associata alle varianti instabili dell'Hb può manifestarsi in vari modi ed essere prodotta da cause diverse (Tabella 5). In particolare, gli episodi emolitici acuti sono frequentemente associati alla somministrazione di farmaci definiti ossidanti i quali, nella fase iniziale della reazione, permettono il trasferimento di un elettrone dal farmaco all'ossiemoglobina per dare metaemoglobina e H₂O₂, come accade ad esempio con i sulfonamidi (Hb Zurigo). L'emolisi acuta può anche verificarsi a causa della piressia associata ad infezioni a carico, prevalentemente, del tratto respiratorio superiore. L'innalzamento della temperatura corporea di alcuni gradi può accelerare la disgregazione dell'emoglobina intracellulare a tal punto da causare una crisi emolitica (95).

La splenectomia

I globuli rossi danneggiati dal materiale denaturato che precipita al loro interno, passano nella milza e vengono successivamente rimossi dai macrofagi splenici. La conseguente splenomegalia potrebbe quindi comportare la splenectomia come approccio terapeutico nella gestione dei pazienti, tuttavia le evidenze non sono concordi nel ritenere sempre vantaggiosa tale soluzione. Le casistiche riportate in letteratura su soggetti con emoglobine instabili a cui è stata asportata la milza suggeriscono infatti una attenta valutazione delle complicanze, dovute soprattutto ad eventi trombotici, considerando i benefici prodotti (96-99). Pertanto, le recenti raccomandazioni prodotte sull'argomento suggeriscono di ricorrere alla splenectomia solo in caso di anemia grave e/o splenomegalia massiva o sintomatica (100).

I PERCORSI DIAGNOSTICI DI LABORATORIO

Il ruolo del laboratorio nella differenziazione, individuazione e caratterizzazione delle varianti instabili dell'Hb è rimasto nel tempo fondamentale e insostituibile poiché consente al clinico la gestione dei pazienti affetti da una patologia con espressioni eterogenee, una corretta consulenza genetica ed una adeguata prevenzione. In generale, l'approccio diagnostico di 1° livello ai difetti dell'Hb è previsto in molti laboratori, ma spesso, in presenza di difetti talassemici o strutturali complessi, si rende necessario ricorrere al supporto di

laboratori di riferimento. Normalmente gli esami specifici per la ricerca della condizione di portatore di un difetto globinico vengono prescritti a soggetti asintomatici, in altri casi vi possono essere segni e sintomi che fanno già propendere il clinico per la presenza di emoglobinopatie e su questa base viene formulato il quesito clinico. È il caso di pazienti che presentano fenotipi ematologici suggestivi per anemie emolitiche. Tali soggetti sono in prevalenza neonati o bambini che in qualche caso, prima o al compimento dello switch dell'HbF, manifestano stati anemici caratteristici. Conseguentemente, possono pervenire al laboratorio richieste specifiche per la conferma o l'accertamento delle cause di generici stati di anemia. Occorre osservare che il riscontro o il sospetto di una variante Hb non comporta sempre da parte del clinico l'esigenza urgente di una caratterizzazione molecolare, mentre prevale la necessità di conoscerne gli aspetti funzionali e le cause della sintomatologia. Ecco quindi come in questi casi il "laboratorio intermedio di riferimento" rivesta un ruolo importante per rispondere a quesiti più urgenti per la gestione del paziente, mediante esami funzionali o di conferma. Ciò accade soprattutto quando si sospetta un difetto instabile dell'Hb o un'alterata affinità per l'O₂; tuttavia il percorso diagnostico dovrà essere in primo luogo orientato verso esami specifici con potere discriminante nell'ambito delle anemie emolitiche (101). Informazioni sulla familiarità per difetti emoglobinici o comunque informazioni anamnestiche sul soggetto in esame potranno rendere più mirato e veloce tale percorso analitico (102). Nel caso delle anemie emolitiche, specie quando si presentano in forma acuta, una diagnosi in tempi brevi può essere importante, considerando che tali eventi si possono riscontrare in soggetti più fragili come nei neonati o nella prima infanzia.

Nella Tabella 6 sono riportati gli esami ed un commento breve ad alcuni risultati in presenza di varianti instabili. Poiché l'eterogeneità dei difetti genetici si accompagna ad una varietà di fenotipi che difficilmente possono essere riassunti in uno schema o un elenco, le risultanze riportate nella tabella corrispondono alle principali evidenze. Occorre anche osservare che, al di là dei casi direttamente studiati e conclusi dagli autori, le informazioni prodotte negli anni e riportate in letteratura possono essere talvolta discordanti o parziali. Ne consegue che la rarità dei difetti, alcuni dei quali caratterizzati in tempi lontani con metodi diversi, non consente di risalire sempre a comportamenti privi di ambiguità, confrontabili o facilmente classificabili. È per tutti questi motivi che quanto riportato nei vari database deve essere considerato con cautela. Dagli anni '80, in modo crescente, le indagini molecolari ci hanno consentito di accertare più facilmente e più precisamente anche la presenza di vari modificatori genetici, talvolta significativi nelle presentazioni fenotipiche associate ai diversi difetti globinici. (103,104).

1° Livello diagnostico

Parametri e indicatori eritrocitari

È noto come alcuni parametri eritrocitari [il volume cellulare medio (MCV), il contenuto cellulare medio di emoglobina (MCH), la concentrazione totale di emoglobina (Hb) e il numero di globuli rossi (GR)] costituiscano dei riferimenti importanti e irrinunciabili nella diagnosi di laboratorio delle talassemie (105), mentre non hanno in genere lo stesso peso nell'identificazione delle varianti emoglobiniche che in gran parte sono asintomatiche. Nel caso particolare delle varianti instabili tali parametri devono invece essere sempre considerati, anche se in molti casi si discostano poco dalla norma. Le varianti iper-instabili possono presentare valori di MCV diminuiti in diversa misura e, quando è presente la denaturazione completa della globina instabile, si verifica una diminuzione del MCH, simile a quello che si osserva nella β -talassemia. Sarà sempre importante conoscere il valore dell'Hb per poter valutare il grado di una potenziale anemia emolitica. I classici parametri (MCV ed MCH) saranno comunque importanti per determinare anche l'eventuale presenza di trait talassemici associati alle varianti instabili in composti di solito clinicamente significativi. Una valutazione particolare merita l'ematokrito (HCT) che generalmente, con valori elevati (superiori a 50 L/L), indica un potenziale aumento dell'affinità per l'ossigeno (O₂), mentre nei casi di varianti instabili, si presenta sempre con valori pressoché normali, anche quando vi è aumentata affinità. L'anemia emolitica, che si osserva in misura diversa in molte varianti classificate instabili, è dovuta alla precoce distruzione di eritrociti, in particolare quando la velocità di distruzione è maggiore della capacità del midollo osseo di rimpiazzarli. Pertanto, durante l'emolisi, i globuli rossi diminuiscono, il midollo è stimolato a produrne di nuovi e i reticolociti in circolo risultano aumentati. È quindi chiaro che la deviazione dei diversi parametri dai valori di riferimento sarà in relazione ai livelli di denaturazione che subiranno le catene globiniche e, quindi, alla conseguente distruzione dei globuli rossi. La morfologia eritrocitaria non risulta molto alterata se si escludono le modificazioni, dovute anche alla marcata ipocromia, durante i fenomeni emolitici acuti (106); possono invece essere presenti in quantità variabile precipitati e aggregati provenienti dalla denaturazione dell'Hb.

La rilevazione di varianti instabili dell'Hb mediante esami routinari eseguiti in automazione migliorerebbe la nostra capacità di riconoscere queste condizioni. A tale proposito sono stati documentati negli ultimi anni alcuni casi di emoglobinopatie instabili (107,108) che mostravano citogrammi leucocitari anomali con la citometria a flusso. Probabilmente, ma non ancora del tutto dimostrato, tali anomalie sono prodotte dal rilascio di emoglobina instabile durante la lisi dei globuli rossi

Tabella 6

Sintesi degli esami utili e dei riscontri nell'individuazione e caratterizzazione di varianti instabili

1° LIVELLO: caratteristiche eritrocitarie, emoglobiniche e biochimiche (a)

Indici eritrocitari:	
Eritrociti (RBC)	Normali/diminuiti
Emoglobina (Hb)	Generalmente ridotta
Ematocrito (HCT)	Normale/ridotto
Volume Cellulare Medio (MCV)	Non significativamente alterato in assenza di talassemie associate
Contenuto Cellulare Medio (MCH)	Normale/ridotto
Morfologia eritrocitaria	Normale o poco alterata, sferociti assenti, sporadica poichilocitosi

Assetto Hb:

Valutazione quali-quantitativa dell'HbA ₂	Normale nelle α e normale/aumentata nelle β instabili
Valutazione quali-quantitativa dell'HbF	Poco presente nell'adulto. Risulta rallentato lo switch nei neonati
Valutazione quali-quantitativa di varianti (HbX)	In molti casi HbX non evidenziate dai metodi separativi in uso

Indicatori di emolisi:

Reticolociti	Aumentati/normali
Aptoglobina	Fortemente diminuita
Bilirubina	Bilirubina indiretta aumentata
Lattato deidrogenasi	Aumentato

Assetto marziale:

Ferro	Normale/ aumentata
Ferritina	Normale/aumentata
Saturazione della transferrina	Normale/diminuita

LIVELLO Diagnostico Intermedio: conferme e caratterizzazione funzionale

Metodo separativo alternativo	2° esame di conferma in presenza o assenza di HbX
Test di falcizzazione	Negativo
Ricerca di inclusi eritrocitari (BCB Test) a 37 °C	Presenza di eritrociti con inclusi in numero variabile (b)
Test di termolabilità: instabilità "in vitro"	Positività variabile a 37 °C in isopropanolo, o con test a 50 °C
p50	Valore diminuito con alta affinità e aumentato con bassa affinità
Metaemoglobina (MetHb)	Valori superiori all'1% nel 15-20% delle varianti

Alcune caratteristiche generali

- Frequente presenza di urine con pigmento brunastro (dipirroli)
- Rari corpi di Heinz negli eritrociti periferici. Evidenti e consistenti in soggetti splenectomizzati
- Iperplasia eritroblastica a livello midollare
- MetHb sensibilmente aumentata dopo incubazione a 37 °C

2° LIVELLO Diagnostico: caratterizzazione molecolare del DNA o studio della catena globinica

- Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA): quando si sospetta la presenza di talassemie α o β da delezione associate ai difetti strutturali
- Sequenziamento (metodo Sanger): prevalentemente per la caratterizzazione di difetti talassemici e strutturali puntiformi dei geni globinici
- Next generation sequencing (NGS): procedura che consente di estendere lo studio anche ad altri geni non-globinici che possono condizionare l'espressione fenotipica delle varianti Hb
- Spettrometria di massa: quando è utile lo studio strutturale delle catene globiniche

a) I valori di riferimento, quando previsti, variano anche in base all'età dei pazienti;

b) La natura e le caratteristiche delle inclusioni eritrocitarie sono documentate in particolare alla voce 135 della Bibliografia.

nella camera di rilevazione della conta differenziale dei leucociti. Oltre a tali osservazioni, non esistono, ad oggi, strumentazioni che consentano di rivelare o quantificare in automazione e direttamente i prodotti della denaturazione dell'emoglobina instabile nell'eritrocita.

Assetti emoglobinici

Il laboratorio, nel percorso di 1° livello finalizzato prevalentemente alla prevenzione della β talassemia, è in grado di osservare e quantificare, in elettroforesi capillare (CE) o mediante High Performance Liquid

Chromatography (HPLC), molte varianti Hb tra cui quelle più frequenti come l'HbS, HbE, HbC (109,110). Come già detto, sono numerose le varianti instabili che non si riscontrano con tali metodi, (alcune sono riportate nelle Tabelle 1-4), a causa della denaturazione completa della globina immediatamente dopo la sintesi o, successivamente, per la precipitazione parziale o totale del tetramero emoglobinico. In generale, l'osservazione delle varianti mediante tali metodi separativi è condizionata dalle caratteristiche degli aa coinvolti nelle sostituzioni e dal pH utilizzato dai vari sistemi diagnostici, come accade peraltro anche con diverse

varianti non instabili. Tuttavia, quando le varianti instabili si separano dalle altre componenti emoglobiniche, presentano di solito una ridotta percentuale relativa che può far sospettare, già all'inizio del percorso diagnostico, la natura instabile della variante. Inoltre occorre tener presente che le varianti β instabili presentano, in alcuni casi, livelli moderatamente aumentati di HbA₂ (111), con un effetto compensativo a cui talvolta contribuisce anche l'HbF. Occorre aggiungere che talvolta possono essere evidenziate frazioni minori in posizioni riconducibili a componenti Hb degradate, oppure ossidate (metaemoglobina).

Indicatori di emolisi

I reticolociti, elementi cellulari che esprimono il passaggio dagli eritroblasti ai globuli rossi, vengono valutati percentualmente o in quantità assoluta per litro (i.r. nell'adulto: 50-110x10⁹/L; nel neonato: 110-240x10⁹/L). Il conteggio dei reticolociti rappresenta quindi un indice generico dell'attività midollare, in presenza di una anemia acuta o cronica, e dà la misura della risposta eritroide (112-114). Sia i metodi automatizzati che quelli manuali utilizzati per tale conteggio sfruttano la presenza endoeritrocitaria di materiale citoplasmatico che incorpora i coloranti sopravvitali, come il nuovo blu di metilene o il blu brillante di cresile (BCB). Non vi sono evidenze per ritenere che alcuni dei parametri citometrici relativi ai reticolociti, disponibili con le strumentazioni oggi in uso, possano dare indicazioni utili nella differenziazione delle anemie emolitiche prodotte da varianti instabili dell'Hb, come invece appare per altre cause emolitiche (115,116). L'aptoglobina, la bilirubina indiretta e la lattato deidrogenasi sono indicatori sierici appropriati per la fase di differenziazione preliminare delle anemie (113,117,118) e la Tabella 6 riporta i comportamenti attesi in presenza di varianti instabili dell'Hb. I livelli di bilirubina indiretta potrebbero risultare significativamente più elevati in presenza di disordini del relativo metabolismo dovuti alla ridotta attività dell'isoenzima uridin-diphosphate-glucuronil-transferase 1A1 (UGT1A1) associato a mutazioni del gene omonimo (119-121). Tuttavia, mentre l'aumento della bilirubina è stato osservato in soggetti che, oltre a tale difetto, presentavano anemia emolitica dovuta a sferocitosi ereditaria o deficit di G6PD (122-125), non vi sono invece evidenze di aumento con le varianti instabili dell'Hb, fatto dovuto, probabilmente, solo alla mancanza di adeguati approfondimenti analitici molecolari nei casi con importanti iperbilirubinemie.

Assetto marziale

La valutazione del ferro, nel contesto degli esami per la definizione di una anemia emolitica, in particolare nell'ambito della diagnosi di varianti instabili, assume significato nella misura in cui i livelli di emoglobina risultano inferiori alla norma, così come accade per la diagnosi di β talassemia (126,127), ma anche per valutare un eventuale accumulo di ferro in seguito ad una emolisi cronica (128).

Livello diagnostico intermedio

Esami di conferma non specifica

Come raccomandato (127,129,130), l'analisi qualitativa delle componenti patologiche dell'emoglobina trova conferme e maggiori indicazioni mediante l'utilizzo di due diversi metodi: quello cromatografico e quello elettroforetico. Ciò vale, peraltro, anche nel caso delle varianti instabili, soprattutto quando il primo metodo in uso non ha prodotto evidenze nella separazione, oppure ha indicato frazioni poco risolte o componenti minori. Anche il test di falcizzazione deve essere preso in considerazione, dal momento che conosciamo varianti instabili che mostrano positività al test di "sickling" (105) con caratteristiche di migrazione e di eluizione anche diverse dall'HbS (131,132).

Esami specifici per l'osservazione *in vitro* dell'instabilità dell'emoglobina

L'ampia varietà di caratteristiche strutturali associate alle varianti instabili dell'Hb ha sempre reso difficile poter definire un "fenotipo instabile" mediante un unico esame *in vitro*. Il laboratorio ha a disposizione alcuni esami che consentono l'osservazione diretta dell'instabilità dell'Hb utilizzando sostanzialmente gli stessi effetti prodotti anche *in vivo* dal calore o dall'azione di sostanze ossidanti. Tali esami, a 50-55 °C (129) o a 37 °C con isopropanolo 17% (134), consentono di distinguere livelli diversi di instabilità indicati semiquantitativamente con +, ++, +++ (Tabella 5) e caratterizzati da torbidità o precipitazione variabilmente marcata, normalmente più evidente per le β -varianti. Nella Figura 2 è riportato il risultato positivo (+) dell'esame a 37 °C come si osserva più frequentemente nel caso di α -varianti instabili. I risultati degli esami per la determinazione dell'instabilità *in vitro* vengono valutati a tempi diversi di incubazione, ponendo a confronto campioni di normalità nota e trattati nelle stesse condizioni. Il prodotto della denaturazione dell'Hb e della conseguente precipitazione all'interno degli eritrociti, si può invece osservare utilizzando un colorante azoico, come il BCB, dopo incubazione per 30 – 120 minuti a 37 °C. Negli eritrociti di soggetti con Hb instabili, in tali condizioni, è possibile mettere in evidenza inclusi simili, ma in genere più grossolani, rispetto a quelli osservati in soggetti con HbH (Hb H-like). Tali inclusi sono particolarmente evidenti con le varianti β , meno con le α , e livelli di instabilità diversi si possono riconoscere in relazione al tempo di incubazione, al numero e alle dimensioni degli inclusi stessi (135). Va detto che la ricerca di inclusi endoeritrocitari rappresenta sempre un esame altrettanto utile e specifico nel percorso di riconoscimento di una emoglobinopatia instabile. Mediante colorazione *in vitro* con violetto di metile o con BCB, si possono riconoscere, nel sangue di soggetti portatori di varianti instabili, anche elementi endoeritrocitari denominati corpi di Heinz. Questi appaiono adesi alla membrana e sono costituiti da materiale Hb denaturato. In piccola quantità, tale materiale viene sempre fisiologicamente prodotto nei

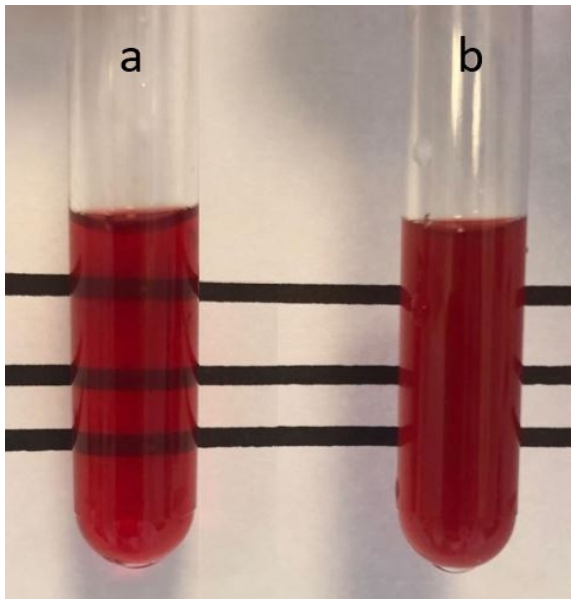


Figura 2
Risultato del test per l'osservazione "in vitro" dell'instabilità dell'emoglobina a 37 °C con isopropanolo 17% (134): a) riscontro negativo (campione limpido) di un soggetto normale di controllo; b) riscontro positivo (campione torbido senza precipitati) di un soggetto portatore di Hb Torino.

soggetti normali, ma non risulta evidenziabile in quanto eliminato efficacemente dai processi emocateretici della milza. Tuttavia, quando la sopravvivenza eritrocitaria è ridotta, la maggior quantità di catene denaturate che precipitano rendono lo smaltimento meno efficace, per cui i corpi di Heinz, che contribuiscono pesantemente al danno eritrocitario e alla splenomegalia (136), risultano evidenti all'osservazione *in vitro*. Nel soggetto splenectomizzato portatore di Hb instabile, i corpi di Heinz appaiono particolarmente in evidenza, numerosi e grossolani.

Metaemoglobina e p50

La metaemoglobina (metHb) è la forma nella quale si presenta l'emoglobina quando il ferro nel gruppo eme passa dal normale stato ferroso (Fe^{2+}) allo stato ferrico (Fe^{3+}). In tale configurazione l'emoglobina non può legare l'ossigeno, producendo conseguentemente anemia funzionale e mancato rilascio di ossigeno ai tessuti. Un aumento significativo dei valori di metHb, oltre il normale livello del 2%, è una caratteristica tipica di rare forme di varianti Hb prodotte da mutazioni dei geni globinici α o β , noti come emoglobine M, ereditate con fenotipo autosomico dominante (137,138). I soggetti con livelli di metHb inferiori al 25% sull'emoglobina totale sono generalmente asintomatici, mentre quelli con valori superiori al 30% presentano cianosi (colorazione bluastra della pelle e delle mucose) e sintomi di ipossia (dispnea, cefalea, vertigini, alterazione dello stato mentale) progressivamente più marcati. Un aumento

della metHb oltre il 2%, e solitamente inferiore al 15%, accompagna sovente anche i soggetti con varianti instabili. Questo parametro, che viene misurato direttamente in emogasanalisi su sangue arterioso ed espresso come quota percentuale sul totale dell'emoglobina (139), può rappresentare un indice indiretto della presenza e delle caratteristiche di una anemia emolitica prodotta da una variante instabile dell'Hb (140) e costituisce un importante indice diagnostico in caso di ipossia. Occorre comunque sempre ricordare che la maggior parte delle cause di iper metHb esulano dalla presenza di emoglobinopatie (141,142).

L'affinità per l' O_2 è rappresentata dal parametro p50 e deriva dal calcolo di parametri rilevati in emogasanalisi: esprime la pressione parziale dell' O_2 (PaO_2) alla quale l'Hb è saturata al 50% e presenta valori di riferimento compresi nell'intervallo 24-28 mmHg (3,2-3,8 kPa) (139). Nel caso di varianti Hb si possono osservare valori di p50 variabilmente diminuiti con affinità aumentata e valori aumentati con affinità diminuita. Altre considerazioni sull'argomento sono già state riportate nel paragrafo "Varianti instabili e affinità per l'ossigeno".

2° Livello diagnostico

La caratterizzazione molecolare

Gli esami preliminari e quelli intermedi possono evidenziare o far sospettare la presenza di un difetto strutturale dell'Hb; tali esami possono dimostrare una instabilità strutturale, alterazioni ematologiche e funzionali. In molti casi però, come già detto, non vi sono le evidenze di difetti Hb, ma piuttosto fenotipi caratterizzati da anemia emolitica non definita o storie cliniche che prefigurano meccanismi di trasmissione dominanti o caratteristiche *de novo*. La caratterizzazione molecolare è sempre necessaria e auspicabile a completamento di un percorso di conoscenza utile al clinico.

Le varianti Hb studiate prima degli anni '80 venivano ben caratterizzate dal punto di vista biochimico e funzionale, ma molto meno per quanto riguardava la ricerca delle interazioni con difetti talassemici (143); ciò è avvenuto naturalmente per la scarsa evoluzione di strumenti adeguati e di sufficienti conoscenze relative all'indagine genetica molecolare. Oggi invece appare doveroso procedere alla caratterizzazione anche di composti o associazioni complesse, mediante lo studio del DNA, al fine di contribuire per quanto fattibile, alla conoscenza di possibili fattori attenuanti o aggravanti i fenotipi clinici osservati. Sporadicamente, inoltre, si può risalire alla composizione amminoacidica con tecniche di spettrometria di massa, come può accadere in situazioni molto rare e particolari come quelle prodotte da fenomeni di mosaicism (144).

Il percorso diagnostico molecolare oggi prevede, ancora nella maggior parte dei casi, uno studio del DNA con sequenziamento secondo Sanger e con le tecniche

molecolari tradizionali, come indicato dalle raccomandazioni dedicate (127). Tuttavia l'approccio possibile e utile, già oggi e ancor più nel futuro prossimo, è quello con metodologie di sequenziamento di nuova generazione (Next generation sequencing, NGS) o sequenziamento in parallelo, con conseguente possibilità di allargare l'indagine a tutti i geni noti e potenzialmente coinvolti con i difetti globinici (Tabella 6), comprendendo anche quelli di più recente osservazione (145). In alcune circostanze può essere utile studiare l'intero esoma mediante *whole-exome sequencing* (WES), come è stato dimostrato in rari casi di anemia emolitica con fenotipi particolarmente atipici, riuscendo a rivelare la presenza di varianti dominanti instabili dell'Hb o di eventi *de novo* (146,147).

La previsione del fenotipo al servizio della consulenza genetica prenatale, alla nascita e nell'adulto

Le potenzialità dell'analisi molecolare consentono lo studio dei geni ad ogni età. In epoca fetale (148-150) si cercano, in particolare, i difetti potenzialmente causativi di condizioni marcate, in genere TDT, mentre nel soggetto adulto il laboratorio vive spesso l'esperienza di dover rispondere, con pochi elementi anamnestici a disposizione, a quesiti posti dal clinico per soggetti in cui si hanno o si sospettano genericamente difetti emoglobinici. Nella Tabella 7 è riportata una sintesi delle caratteristiche riconducibili alle varianti instabili con alcune considerazioni che potrebbero orientare gli esami, suggerendo percorsi diagnostici e quindi conclusioni di laboratorio più mirate. È evidente che nel caso di difetti rari, unici e nuovi il compito del laboratorio può essere arduo e quindi di frequente si procede per

analogia con varianti Hb già studiate con caratteristiche o riscontri analitici simili. Occorre ricordare che è rara la possibilità che si presentino le condizioni per sospettare lo stato omozigote per una Hb instabile. Meno rara è l'ipotesi che una variante instabile possa invece formare un composto con un difetto talassemico o si presenti associata ad altri fattori in grado di rendere più marcato il conseguente fenotipo. Tra i suddetti fattori ve ne sono alcuni che possono mostrare altrettanti fenomeni emolitici ed essere prevalenti nella popolazione, come il deficit di G6PD (151). L'eterogeneità fenotipica, più volte sottolineata, è tale che ogni variante instabile costituirà una condizione unica da valutarsi caso per caso. A tale scopo potranno essere trovati importanti riferimenti nella vasta letteratura prodotta nel tempo, nelle linee guida (127) e nei numerosi database dedicati (5,6,152-155).

Il laboratorio e la diagnosi delle varianti instabili alla nascita e nei primi mesi di vita

La ricerca delle cause che possono produrre una anemia emolitica nel neonato (entro i 28 giorni dalla nascita) o comunque nei primi mesi di vita può portare alla richiesta di esami per la ricerca di eventuali emoglobinopatie. In tale periodo della vita, una anemia prodotta da Hb instabili rappresenta una evenienza molto più rara rispetto ad altre possibili cause di emolisi (3,156). Tuttavia, molte varianti instabili delle catene β presentano un esordio precoce, in concomitanza con lo switch dell'HbF (157). Le raccomandazioni per la diagnostica alla nascita (158) fanno sovente riferimento alla difficile interpretazione dei risultati dei test globinici, a causa soprattutto della presenza di elevate quantità di HbF e dei cambiamenti continui, non sempre uniformi, che caratterizzano proprio lo switch HbF \rightarrow HbA (159).

Tabella 7

Sintesi delle caratteristiche e delle opzioni che il laboratorio deve considerare nell'affrontare lo studio dei difetti associati alle emoglobine instabili

Caratteristiche generali

- Producono anemie di grado diverso e con modalità variabili
- Possono presentarsi come difetti *de novo*
- Si trasmettono con un meccanismo dominante o recessivo
- Talvolta producono fenotipi simil-talassemici
- L'esordio prevalente è nella prima infanzia ma dipende dai geni globinici coinvolti
- Con difetti talassemici esprimono fenotipi variabili ma sempre significativamente marcati
- Presentano corpi di Heinz evidenti soprattutto dopo splenectomia
- Gli inclusi Hb H-like prodotti *in vitro* si presentano con caratteristiche qualitative e quantitative molto variabili
- Sovente presentano alterata affinità per l'O₂
- Esprimono fenotipi diversi in relazione ai geni globinici coinvolti
- Non sono prevalenti o caratteristici in aree geografiche o etnie particolari
- Sono considerate "difetti rari" ma sovente non vengono riconosciute e risultano sottovalutate
- Possono presentare quadri clinici tali da suggerire la splenectomia che tuttavia deve essere valutata con attenzione e prudenza

Approccio allo studio e alla diagnosi di laboratorio

- Importante conoscere la storia clinica del paziente prima di iniziare il percorso di laboratorio
- Necessario discriminare le diverse cause dell'emolisi con test dedicati
- I test dedicati per le Hb instabili in genere non sono automatizzati e standardizzati
- In molti casi i test separativi per l'Hb non consentono di evidenziare la presenza delle varianti instabili
- I test funzionali devono essere eseguiti in accordo con le indagini strutturali
- L'esame molecolare è sempre necessario

Fino ai primi 3 mesi, la quantità relativa di catene β è sensibilmente più bassa rispetto alle catene α e γ prodotte e quindi l'eventuale denaturazione delle poche catene β instabili non è in grado di produrre segni clinici particolarmente significativi. I test specifici per la determinazione *in vitro* dell'instabilità sono scarsamente utilizzabili quando l'HbF è presente in quantità superiore al 10%. L'HbF potrebbe infatti esaltare o mimare la positività dei test con evidenze falsamente positive e rendere quindi difficile accertare o escludere la presenza di una emoglobinopatia. È quindi importante che il laboratorio valuti con attenzione l'appropriatezza degli esami richiesti e la consistenza dei risultati quando è evidente che lo switch dell'HbF non è giunto a naturale completamento. I valori alterati degli indicatori di emolisi e/o della metHb e/o della bilirubina possono essere associati ad uno stato emolitico, nel neonato come nell'adulto, ma non specificatamente all'eventuale effetto prodotto da una emoglobinopatia instabile.

Statisticamente, nei primi mesi di vita vengono richiesti con maggior frequenza al laboratorio gli esami di approfondimento conseguenti all'osservazione di uno stato anemico o di una marcata iperbilirubinemia (prevalentemente di tipo indiretto). Per una corretta valutazione di tale aumento di bilirubina, per la sua elevata frequenza e per la varietà di fattori ereditari, anche riconducibili alle emoglobinopatie che possono generarla, si rendono indispensabili approfondimenti per evitare tra l'altro una generica classificazione di "ittero idiopatico" (160-162).

I metodi separativi per la definizione dell'assetto Hb hanno sempre un ruolo importante nell'individuare la presenza di varianti e, come già detto a proposito di tali esami nei soggetti adulti, sono molti i difetti strutturali dei geni globinici che anche nel neonato non si rendono visibili. Tuttavia nei primi mesi di vita potrebbero essere osservate varianti γ , ovvero HbF-X ($\alpha_2\gamma_2^x$), non visibili nell'adulto e che, quando sono instabili, producono anch'esse fenomeni emolitici (163-165). Anche varianti α instabili possono essere osservate nei primi mesi, quelle stesse che possono essere rilevate in età adulta. Tali varianti HbX ($\alpha_2^x\beta_2$) sono presenti in piccola quantità, mentre l'HbFX ($\alpha_2^x\gamma_2$) che si forma con le catene mutate α^x viene separata in quantità significativamente maggiore.

Alla luce di tali considerazioni si deve ribadire che i quesiti inviati al laboratorio, soprattutto per la ricerca di eventuali varianti instabili dell'emoglobina, devono essere sempre supportati da notizie cliniche relative al paziente e alla sua famiglia. L'esperienza di laboratorio insegna che in molti casi è necessario procedere con esami di 2° livello (166), i quali peraltro, in base alla valutazione clinica, possono essere differiti o subordinati alla ripetizione degli esami biochimici e dell'assetto Hb al completamento dello switch dell'HbF.

CONCLUSIONI

In questa rassegna si è inizialmente dedicato spazio ai numerosi cambiamenti strutturali che danno origine

alle emoglobine instabili e quindi ai fenotipi associati. Nella seconda parte sono stati esaminati diversi metodi analitici per l'individuazione e la caratterizzazione di questi difetti instabili dell'emoglobina, sovente poco considerati anche dai laboratori che si occupano di emoglobinopatie. Il modello di trasmissione autosomico dominante che caratterizza gran parte delle emoglobine instabili comporta che i difetti ad esse associati siano in grado di produrre anemie emolitiche anche allo stato eterozigote. Occorre osservare che le emoglobinopatie instabili, caratterizzate da una eterogeneità di fenotipi clinici e di quadri ematologici ed emoglobinici, risultano sovente sotto-diagnosticate o non correttamente valutate nell'ambito delle consulenze genetiche. Oggi, che tutto sembra indirizzare velocemente verso l'analisi molecolare, deve essere ribadita l'importanza di poter risalire alle caratteristiche funzionali e alla definizione della stabilità della struttura globinica quando, dopo aver eseguito gli esami di 1° livello si sospetta la presenza di una emoglobina instabile. Queste sono le prime e urgenti risposte che il laboratorio è chiamato a produrre al clinico, sovente in un'ottica differenziale, per la prevenzione e la gestione di una anemia emolitica. Tuttavia, gli strumenti diagnostici molecolari disponibili allo stato attuale, e ancor più quelli del futuro, nonché l'utilizzo di moderni database, ci potranno aiutare a svelare anche nuovi difetti strutturali e interazioni con altri geni, con l'obiettivo di contribuire sempre più e meglio alla prevenzione, alla gestione delle consulenze genetiche dedicate e alla cura di questi difetti rari (150-153,167,168).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Haley K. Congenital Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* 2017;101:361-74.
- Guillaud C, Loustau V, Michel M. Hemolytic anemia in adults: main causes and diagnostic procedures. *Expert Rev Hematol* 2012;5:229-41.
- Manzato F, Franchini M, Vescovi PP. Emolisi in vivo. Parte I: classificazione. *Biochim Clin* 2014;38:92-102.
- Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, eds. *Disorders of Hemoglobin Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*, 2nd ed. New York (NY, USA): Cambridge University Press, 2009.
- HbVar database for human hemoglobin variants and thalassemia mutations. <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html> bx.psu.edu (ultimo accesso: ottobre 2021).
- ITHANET Portal (www.ithanet.eu) (ultimo accesso: ottobre 2021).
- Sansone G, Carrell R, Lehmann H. Haemoglobin Genova: $\beta 28$ (B10) Leucine→Proline. *Nature* 1967;214:877-9.
- Beretta A, Prato V, Gallo E, et al. Haemoglobin Torino - $\alpha 43$ (CDI) Phenylalanine→Valine. *Nature* 1968;217:1016-8.
- Ivaldi G, David O, Baffico M, et al. Hb Trento: an elongated C-terminal beta chain due to a new frameshift mutation [β 144 (-A)]. *Hemoglobin* 2003;27:15-25.
- Perutz MF, Kendrew JC, Watson HC. Structure and function of hemoglobin. II. Some relations between

- polypeptide chain configuration and amino-acid sequence. *J Mol Biol* 1965;13:669-78.
11. Huisman THJ, Schroeder WA. New aspects of the structure, function and synthesis of haemoglobins. CRC Monoscience Series Butterworth & Co Publishers Ltd, 1971.
 12. Perutz MF, Muirhead H, Cox JM, et al. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature* 1968;219:131-9.
 13. Hrkal Z, Vodr azka Z. A study of the conformation of human globin in solution by optical methods. *Biochim Biophys Acta* 1967;133:527-34.
 14. Liebhaber SA, Kan YM. Differentiation of the mRNA transcripts origination from alpha1- and alpha2 globin loci in normals and alpha-thalassemics. *J Clin Invest* 1981;68:439-46.
 15. Rosemeyer MA, Huens ER. On the mechanism of the dissociation of haemoglobin. *J Mol Biol* 1967;25:253-73.
 16. Griffon N, Baudin V, Dieryck W, et al. Tetramer-dimer equilibrium of oxyhemoglobin mutants determined from auto-oxidation rates. *Protein Science* 1998;7:673-80.
 17. Carrell RW, Lehmann H, Lorkin PA, et al. Haemoglobin Sydney: Beta-67 (E11) valine modified to alanine: an emerging pattern of unstable haemoglobins. *Nature* 1967;215:626-8.
 18. Ohba Y. Unstable hemoglobins. *Hemoglobin* 1990;14:353-88.
 19. Zinkham WH, Houtchens RA, Caughey WS. Relation between variations in the phenotypic expression of an unstable hemoglobin disorder (hemoglobin Z urich) and carboxyhemoglobin levels. *Am J Med* 1983;74:23-9.
 20. Aguinaga MP, Wright CJ, Roa PD, et al. Molecular diagnosis and characterization of Hb Z urich [beta63(E7)His>Arg] carriers in a Kentucky family. *Hemoglobin* 1998;22:509-15.
 21. Josephson AM, Weinstein HG, Yakulis VJ, et al. A new variant of hemoglobin M disease: hemoglobin M-Chicago. *J Lab Clin Med* 1962;59:918-25.
 22. Ranney HM, Jacobs AS, Udem L, et al. Hemoglobin Riverdale-Bronx an unstable hemoglobin resulting from the substitution of arginine for glycine at helical residue B6 of the B beta polypeptide chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;33:1004-5.
 23. Lorkin PA, Pietschmann H, Braunsteiner H, et al. Structure of haemoglobin Wien beta 130 (H8) tyrosine-aspartic acid: an unstable haemoglobin variant. *Acta Haematol* 1974;51:351-61.
 24. McDonald MJ, Michalski LA, Turci SM, et al. Structural, functional, and subunit assembly properties of hemoglobin Attleboro [alpha 138 (H21) Ser>Pro], a variant possessing a site maturation at a critical C-terminal residue. *Biochemistry* 1990;29:173-8.
 25. Qualtieri A, Andreoli V, Crescibene L, et al. Hb Valletta [beta 87 (F3)Thr>Pro] due to an A→C substitution at codon 87 in a Calabrian family with alpha-thalassemia. *Hemoglobin* 1997;21:97-103.
 26. Lokich JJ, Moloney WC, Bunn HF, et al. Hemoglobin Brigham (alpha2Abeta2100 Pro→Leu). Hemoglobin variant associated with familial erythrocytosis. *J Clin Invest* 1973;52:2060-7.
 27. Asakura T, Adachi K, Wiley JS, et al. Structure and function of haemoglobin Philly (Tyr C1 (35) beta replaced by Phe). *J Mol Biol* 1976;104:185-95.
 28. Dacie JV, Shinton NK, Gaffney PJ Jr, et al. Haemoglobin Hammersmith (beta-42 (CD1) Phe replaced by ser). *Nature* 1967;216:663-5.
 29. Keeling MM, Ogden LL, Wrightstone RN, et al. Hemoglobin Louisville (beta-42 (CD1) phe-leu): an unstable variant causing mild hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1971;50:2395-402.
 30. Zhao W, Wilson JB, Huisman TH. Low quantities of Hb Boyle Heights or alpha 2(6)(A4)Asp→0 beta 2 observed in three members of a Caucasian family. *Hemoglobin* 1990;14:637-40.
 31. De Jong WW, Went LN, Bernini LF. Haemoglobin Leiden: deletion of beta-6 or 7 glutamic acid. *Nature* 1968;220:788-90.
 32. Jones RT, Brimhall B, Huisman TH, et al. Hemoglobin Freiburg: abnormal hemoglobin due to deletion of a single amino acid residue. *Science* 1966;154:1024-7.
 33. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable hemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
 34. de Castro CM, Devlin B, Fleenor DE, et al. A novel beta-globin mutation, beta Durham-NC [beta 114 Leu>Pro], produces a dominant thalassemia-like phenotype. *Blood* 1994;83:1109-16.
 35. Efremov GD, Wrightstone RN, Huisman TH, et al. An unusual hemoglobin anomaly and its relation to alpha-thalassemia and hemoglobin-H disease. *J Clin Invest* 1971;50:1628-36.
 36. De Jong WW, Meera Khan P, Bernini LF. Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. *Am J Hum Genet* 1975;27:81-90.
 37. Liebhaber SA, Kan YW. Alpha-Thalassemia caused by an unstable alpha-globin mutant. *J Clin Invest* 1983;71:461-6.
 38. Favero ME, Ferreira Costa F. Alpha-Hemoglobin-Stabilizing protein: an erythroid molecular chaperone. *Biochem Res Int* 2011;373859.
 39. Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. α-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of β-thalassaemia. *Br J Haematol* 2006;133:675-82.
 40. Feng L, Gell DA, Zhou S, et al. Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of α-hemoglobin. *Cell* 2004;119:629-40.
 41. Barberio G, Ivaldi G. Le catene alfa-globiniche libere e il gene AHSP. In: Emoglobinopatie dalla diagnosi alle consulenze specialistiche. Padova: Piccin Editore, 2020:62-4.
 42. Codrington JF, Kutlar F, Harris HF, et al. Hb A2-Wrens or alpha 2 delta 2 98(FG5) Val→Met, an unstable delta chain variant identified by sequence analysis of amplified DNA. *Biochim Biophys Acta* 1989;1009:87-9.
 43. Barberio G, Moggi M, Maffei M, et al. Appropriata valutazione dell'HbA2 nella prevenzione dei difetti talassemici: il caso dell'HbA2-Sile δ3 (NA3) Leu→Pro [HBD:c.11T>C; p.Leu4Pro]. *Atti 4° Congresso Nazionale SIPMel*, 2018.
 44. Bento C, Magalhães Maia T, Carvalhais I, et al. Transient neonatal cyanosis associated with a new Hb F variant: Hb F viseu. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:e77-80.
 45. Crowley MA, Mollan TL, Abdulmalik OY, et al. A hemoglobin variant associated with neonatal cyanosis and anemia. *N Engl J Med* 2011;364:1837-43.
 46. Pirastru M, Mereu P, Trova S, et al. Hb F-Avellino [(G)γ41(C7)Phe→Leu; HBG2: c.124 T>C]: A New Hemoglobin Variant Observed In A Healthy Newborn. *Hemoglobin* 2016;40:61-3.
 47. Pirastru M, Mereu P, Trova S, et al. A new unstable variant of the fetal hemoglobin HBG2 gene: Hb F-Turritana [(G)γ64(E8)Gly→Asp, HBG2:c.194G>A] found in cis to the Hb F-Sardinia gene [(A)γ(E19)Ile→Thr, HBG1:c.227T>C]. *Eur J Haematol* 2014;92:510-3.
 48. Wajzman H, Galact ros F. Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. *Hemoglobin* 2005;29:91-106.
 49. Huehns ER, Hecht F, Yoshida A, et al. Hemoglobin-Seattle

- (alpha-2 beta-2 76-Glu): an unstable hemoglobin causing chronic hemolytic anemia. *Blood* 1970;36:209-18.
50. De Furia FG, Miller DR. Oxygen affinity in hemoglobin Köln disease. *Blood* 1972;39:398-406.
 51. Aguinaga MP, Wright CJ, Roa PD, et al. Molecular diagnosis and characterization of Hb Zürich [beta63(E7)His→Arg] carriers in a Kentucky family. *Hemoglobin* 1998;22:509-15.
 52. White JM, Brain MC, Lorkin PA, et al. Mild "unstable haemoglobin haemolytic anaemia" caused by haemoglobin Shepherds Bush(B74(E18) Gly→Asp). *Nature* 1970;225:939-41.
 53. Wajcman H, Galactéros F. Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. *Hemoglobin* 2005;29:91-106.
 54. David O, Ivaldi G, Rabino-Massa E, et al. Functional studies on nine different haemoglobins with high oxygen affinity. *Acta Haematol* 2002;108:132-8.
 55. Bellingham AJ, Huehns ER. Compensation in haemolytic anaemias caused by abnormal haemoglobins. *Nature* 1968;218:924-6.
 56. Prato V, Gallo E, Ricco G, et al. Haemolytic anaemia due to haemoglobin Torino. *Br J Haematol* 1970;19:105-15.
 57. Bruns CM, Thet LA, Woodson RD, et al. Hemoglobinopathy case finding by pulse oximetry. *Am J Hematol* 2003;74:14-3.
 58. Verhovsek M, Henderson MPA, Cox G, et al. Erratum to: unexpectedly low pulse oximetry measurements associated with variant hemoglobins: a systematic review. *Am J Hematol* 2010;85:822-5.
 59. Deyell R, Jackson S, Spier S, et al. Low oxygen saturation by pulse oximetry may be associated with a low oxygen affinity hemoglobin variant, Hemoglobin Titusville, JPediatr Hematol Oncol 2006;28:100-2.
 60. Srivastava P, Kaeda JS, Roper D, et al. Severe hemolytic anemia associated with the homozygous state for an unstable hemoglobin variant (Hb Bushwick). *Blood* 1995;86:1977-82.
 61. Kai Huang, Shijun Ge, Wei Yi, et al. Interactions of unstable hemoglobin Rush with thalassemia and hemoglobin E result in thalassemia intermedia. *Hematology* 2019;24:459-66.
 62. Badens C, Paolasso C, Fossat C, et al. Compound heterozygosity for unstable hemoglobin Genova and beta(o)-thalassemia associated with early onset of thalassemia major syndrome. *Haematologica* 2005;90:ECR04.
 63. Ranney HM, Sharma VS, Noble RW. Unstable hemoglobins and thalassemia: some properties of Hb Köln. *Ann N Y Acad Sci* 1974;232:293-6.
 64. Efremov GD. Dominantly inherited beta-thalassemia. *Hemoglobin* 2007;31:193-207.
 65. Wajcman H, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, et al. Unstable and thalassaemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of Hb H disease and thalassemia intermedia. *Hemoglobin* 2008;32:327-49.
 66. Frischer H, Bowman J. Hemoglobin E. An oxidatively unstable mutation. *J Lab Clin Med* 1975;85:531-9.
 67. Rees DC, Clegg JB, Weatherall DJ. Is hemoglobin instability important in the interaction between hemoglobin E and β thalassemia? *Blood* 1998;92:2141-6.
 68. Orkin SH, Kazazian HH, Antonarakis SE, et al. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of β E-globin gene. *Nature* 1982;300:768-9.
 69. Traeger J, Wood WG, Clegg JB, et al. Defective synthesis of Hb E is due to reduced levels of β E mRNA. *Nature* 1980;288:497-9.
 70. Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a011734.
 71. Ekwattanakit S, Riouueang S, Viprakasit V. Interaction between Hb E and Hb Yala (HBB:c.129delT); a novel frameshift beta globin gene mutation, resulting in Hemoglobin E/ β 0 thalassemia. *Hematology* 2018;23:117-21.
 72. Halbrecht I, Isaacs WA, Lehmann H, et al. Hemoglobin Hasharon (alpha 47 aspartic acid→histidine). *Isr J Med Sci* 1967;3:827-31.
 73. Ostertag W, Smith EW. Hb Sinai, a new alpha chain mutant alpha his 47. *Humangenetik* 1968;6:377-9.
 74. Charache S, Mondzac AM, Gessner U. Hemoglobin Hasharon (alpha-2-47 his(CD5)beta-2): a hemoglobin found in low concentration. *J Clin Invest* 1969;48:834-47.
 75. Mavilio F, Marinucci M, Massa A, et al. Hemoglobin Hasharon [alpha 247 (CD5)Asp leads to His beta 2] linked to alpha-thalassemia in northern Italian carriers. Hematological and biosynthetic studies. *Acta Haematol* 1980;63:305-11.
 76. Bender JW, Reilly MP, Asakura T. Molecular stability and function of hemoglobins Hasharon (alpha(2)47 (CD5)Asp→His beta 2) and Hasharon (alpha(2)47 (CD5)Asp→His delta 2). *Hemoglobin* 1984;8:61-73.
 77. Adams JG, Heller P, Abramson RK, et al. Sulfonamide-induced hemolytic anemia and hemoglobin Hasharon. *Arch Intern Med* 1977;137:1449-51.
 78. Molchanova TP, Pobedimskaya DD, Huisman TH. The differences in quantities of alpha 2- and alpha 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br J Haematol* 1994;88:300-6.
 79. Giglioni B, Comi P, Taramelli R, et al. Organization of alpha-globin genes in Hb Hasharon (alpha 47 asp replaced by his) carriers. *Blood* 1980;56:1145-9.
 80. Pich P, Saglio G, Camaschella C, et al. Interaction between Hb Hasharon and alpha-thalassemia: an approach to the problem of the number of human alpha loci. *Blood* 1978;51:339-46.
 81. Levine RL, Lincoln DR, Buchholz WM, et al. Hemoglobin Hasharon in a premature infant with hemolytic anemia. *Pediatr Res* 1975;9:7-11.
 82. Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001.
 83. Hartevelde, CL, Higgs, DR α -thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:13.
 84. Fucharoen S, Winichagoon P, Pootrakul P, et al. Differences between two types of Hb H disease, alpha-thalassemia 1/alpha-thalassemia 2 and alpha-thalassemia 1/Hb Constant Spring. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987;23:309-15.
 85. WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. 2011. http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011. (ultimo accesso: ottobre 2021)
 86. Jandrić Balen M, Lukenda V, Jandrić I, et al. HbA1C - overall glycemia marker and hemolytic anemia indicator. *Med Glas (Zenica)* 2012;9:406-8.
 87. Debar A, Charmion S, Ben Ameer S, et al. Inappropriate low glycated hemoglobin and hemolysis. *Rev Med Internet* 2009;30:525-7.
 88. Finan E, Joseph J. Glycosylated haemoglobin: a false sense of security. *BMJ Case Rep* 2018;11:e227668.
 89. Aggarwal N, Rai AK, Kupfer Y, et al. Immeasurable glycosylated haemoglobin: a marker for severe haemolysis. *BMJ Case Reports* 2013;2013:bcr2013200307.
 90. Hain RD, Chitayat D, Cooper R, et al. Hb FM-Fort Ripley: confirmation of autosomal dominant inheritance and diagnosis by PCR and direct nucleotide sequencing. *Hum Mutat* 1994;3:239-42.
 91. Veltman J, Brunner H. De novo mutations in human

- genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012;13:565-75.
92. Carrell RW, Winterbourn CC. The unstable hemoglobins. *Tex Rep Biol Med* 1980-1981;40:431-45.
 93. Stamatoyannopoulos G, Nute PE, Miller M. De novo mutations producing unstable Hbs of Hbs M. I. Establishment of a depository and use of data to test for an association of de novo mutation with advanced parental age. *Hum Genet* 1981;58:396-404.
 94. Stamatoyannopoulos G, Nute, P.E. De novo mutations producing unstable Hbs or Hbs M. *Hum Genet* 1982;60:181-8.
 95. Wallace WJ, Volpe JA, Maxwell JC, et al. Properties of hemoglobin A and hemoglobin Zurich (beta63 histidine replaced by arginine): quantitative evaluation of functional abnormalities in hemoglobins. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;68:1379-86.
 96. Hill QA, Farrar L, Lordan J, et al. A combination of two novel alpha globin variants Hb Bridlington (HBA1) and Hb Taybe (HBA2) resulting in severe hemolysis, pulmonary hypertension, and death. *Hematology* 2015;20:50-2.
 97. Lode HN, Krings G, Schulze-Neick I, et al. Pulmonary hypertension in a case of Hb-Mainz hemolytic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:173-7.
 98. Thuret I, Bardakdjian J, Badens C, et al. Priapism following splenectomy in an unstable hemoglobin: hemoglobin Olmsted beta 141 (H19) Leu→Arg. *Am J Hematol* 1996;51:133-6.
 99. Kim BJ, Park KW, Koh SB, et al. Stroke induced by splenectomy in hemoglobin Madrid: autopsy clues to the underlying mechanism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:141-4.
 100. Iolascon A, Andolfo I, Barcellini W, et al. Working Study Group on red cells and iron of the EHA. Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematologica* 2017;102:1304-13.
 101. Bain BJ. Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis. In: *Haemoglobinopathy Diagnosis* (3rd ed). John Wiley & Sons Ltd; 2020:30-84.
 102. Trent RJ. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev* 2006;27:27-38.
 103. Thein SL. Genetic basis and genetic modifiers of beta-thalassemia and sickle cell disease. *Adv Exp Med Biol* 2017;1013:27-57.
 104. Shefer Averbuch N, Steinberg-Shemer O, Dgany O, et al. Targeted next generation sequencing for the diagnosis of patients with rare congenital anemias. *Eur J Haematol* 2018;101:297-304.
 105. Old J, Hartevelde CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders: Volume 2: Laboratory Protocols [Internet]. 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2012.
 106. Williamson D. The unstable haemoglobins. *Blood Rev* 1993;7:146-63.
 107. M. Rosetti, G. Poletti, A. Sensi, et al. A rare case of hemoglobin Leiden interfering with the DIFF channel of Sysmex XE-2100. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:436-7.
 108. Mongelli F, Barberio G, Ivaldi G. A rare and unstable hemoglobin variant, Hb M Dothan β 25/26 (-GTG), detected by the anomalous cytogram on Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:e31-3.
 109. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol* 2009;31:484-95.
 110. Degandt S, Coens R, Cauwelier B, et al. Evaluation of four hemoglobin separation analyzers for hemoglobinopathy diagnosis. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22224.
 111. Ivaldi G, Barberio G, Hartevelde C, et al. HbA2 measurements in beta-thalassemia and in other conditions. *Thalassemia Rep* 2014;4:45-8.
 112. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med* 2015;35:133-63.
 113. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Dis Markers* 2015;2015:635670.
 114. Jamwal M, Sharma P, Das R. Laboratory approach to hemolytic anemia. *Indian J Pediatr* 2020;87:66-74.
 115. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. General haematology task force of the British committee for standards in H. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. *Br J Haematol* 2012;156:37-49.
 116. Roper D, Layton M. Investigation of the hereditary hemolytic anemias: membrane and enzyme abnormalities. 11th ed. In: Bain BJ LM BI, Lewis SM, editors. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2012:245-54.
 117. Manzato F, Franchini M, Vescovi PP. Emolisi in vivo. Parte II: algoritmi diagnostici. *Biochim Clin* 2014;38:284-91.
 118. Graziani MS, Caldini A, Basile U, et al. Indicazioni per la misura delle principali proteine sieriche. *Biochim Clin* 2012;36:244-67.
 119. Steventon G. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1. *Xenobiotica* 2020;50:64-76.
 120. Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001;344:581-90.
 121. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, et al. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr* 2012;171:11-5.
 122. Lee JH, Moon KR. Coexistence of Gilbert syndrome and hereditary spherocytosis in a child presenting with extreme jaundice. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2014;17:266-9.
 123. Butorac Ahel I, Baraba Dekanic K, Palcevski G, et al. An infant with unusually high unconjugated hyperbilirubinemia due to coexistence of hereditary spherocytosis and Gilbert syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40:e127-8.
 124. Kumar D, Parakh A, Sharma S. Gilbert syndrome increasing unconjugated hyperbilirubinemia in a child with hereditary spherocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012;34:54-6.
 125. Galanello R, Cipollina M, Carboni G, et al. Hyperbilirubinemia, glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency and Gilbert's syndrome. *Eur J Pediatr* 1999;158:914-6.
 126. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149:35-49.
 127. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015;23:426-37.
 128. Fibach E, Rachmilewitz EA. Iron overload in hematological disorders. *Presse Med* 2017;46:e296-e305.
 129. Raccomandazioni per la diagnostica di primo livello delle emoglobinopatie-SITE 2012 http://www.site-italia.org/collana_scientifica.php. (ultimo accesso ottobre 2021).
 130. Kutlar F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin* 2007;31:243-50.
 131. Felio-Torres A, Eberle SE, Bragós IM, et al. Hb S-San Martin: a new sickling hemoglobin with two amino acid substitutions [β 6(A3)Glu→Val; β 105(G7)Leu→Pro] in an Argentinean family. *Hemoglobin* 2010;34:500-4.
 132. Moo-Penn WF, Schmidt RM, Jue DL, et al. Hemoglobin S

- Travis: a sickling hemoglobin with two amino acid substitutions [beta6(A3) glutamic acid leads to valine and beta142 (H20) alanine leads to valine]. *Eur J Biochem* 1977;77:561-6.
133. Dacie JC, Lewis SM. *Practica Hematology*, 5th edn. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone, 1975:227-33.
 134. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.
 135. Sansone G, Sciaratta GV, Ivaldi G, et al. Hb H-like in red cells of patients with unstable haemoglobin. *Haematologica* 1987;72:481-6.
 136. Winterbourn CC, Carrell RW. Studies of hemoglobin denaturation and Heinz body formation in the unstable hemoglobins. *J Clin Invest* 1974;54:678-89.
 137. Kumar GV, Sharma P, Chhabra S, et al. Hb M-Iwate in an Indian family. *Clin Chim Acta* 2015;446:192-4.
 138. Gerald PS, Efron ML. Chemical studies of several varieties of Hb M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1758-67.
 139. Pezzati P, Tronchin M, Messeri G. Emogasanalisi. *Biochim Clin* 2004;28:532-41.
 140. Hojas-Bernal R, McNab-Martin P, Fairbanks VF, et al. Hb Chile [β 28(B10)Leu \rightarrow Met]: An unstable hemoglobin associated with chronic methemoglobinemia and sulfonamide or methylene blue-induced hemolytic anemia. *Hemoglobin* 1999;23:125-34.
 141. Agarwal AM, Prchal JT. Methemoglobinemia and other dyshemoglobinemias. In: Williams Hematology, 9th ed, Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, et al (Eds). New York: McGraw-Hill Education, 2015:789.
 142. Ashurst J, Wasson M. Methemoglobinemia: a systematic review of the pathophysiology, detection, and treatment. *Del Med J* 2011;83:203-8.
 143. Ricco G, Scaroina F, Burzio P, et al. Functional properties of the unstable Hb-Torino: alpha 43 (CD-1) Phe-Val. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1985;61:619-26.
 144. Iacomelli I, Barberio G, Pucci P, et al. Hemoglobin Yamagata [β 132(H10)Lys \rightarrow Asn; (HBB: c.399A>T)]: a mosaic to be put together. *Clin Chem Lab Med* 2021 23;59:1670-9.
 145. Achour A, Koopmann T, Castel R, et al. A new gene associated with a b-thalassemia phenotype: The observation of variants in SUPT5H. *Blood* 2020;136:1789-93.
 146. Rizzuto V, Koopmann TT, Blanco-Álvarez A, et al. Usefulness of NGS for diagnosis of dominant beta-thalassemia and unstable hemoglobinopathies in five clinical cases. *Front Physiol* 2021;12:628236.
 147. Katsantoni E. Omics studies in hemoglobinopathies. *Mol Diagn Ther* 2019;23:223-34.
 148. Damiani G, Vinciguerra M, Jakil C, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies: from fetoscopy to coelocentesis. *Thal Rep* 2014;4:67-77.
 149. Hooven TA, Hooper EM, Wontakal SN, et al. Diagnosis of a rare fetal haemoglobinopathy in the age of next-generation sequencing. *BMJ Case Reports* 2016;bcr2016215193.
 150. Vrettou C, Kakourou G, Mamas T, et al. Prenatal and preimplantation diagnosis of hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol* 2018;40:74-82.x
 151. Deng Z, Yang F, Bai Y, et al. Co-inheritance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and hemoglobin E in a Kachin population in a malaria-endemic region of Southeast Asia. *PLoS One* 2017;12:e0177917.
 152. Adzhubei A, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248-9.
 153. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361-2.
 154. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research* 2011;39:e118.
 155. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2013;42:D980-5.
 156. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic anemia: evaluation and differential diagnosis. *Am Fam Physician* 2018;98:354-61.
 157. Yates AM, Mortier NA, Hyde KS, et al. The diagnostic dilemma of congenital unstable hemoglobinopathies. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:1393-5.
 158. Ivaldi G, Barberio G, Caruso V, et al. Raccomandazioni per la diagnosi neonatale delle emoglobinopatie. *Biochim Clin* 2015;39:116-34.
 159. Wood WG. Haemoglobin synthesis during human fetal development. *Br Med Bull* 1976;32:282-7.
 160. Christensen RD, Nussenzweig RH, Yaish HM, et al. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *J Perinatol* 2014;34:616-9.
 161. Cortesi V, Manzoni F, Raffaelli G, et al. Severe presentation of congenital hemolytic anemias in the neonatal age: diagnostic and therapeutic issues. *Diagnostics (Basel)* 2021;11:1549.
 162. Bhutani VK, Maisels MJ, Schutzman DL, et al. Identification of risk for neonatal haemolysis. *Acta Paediatr* 2018;107:1350-6.
 163. Bento C, Magalhães Maia T, Carvalhais I, et al. Transient Neonatal Cyanosis Associated With a New Hb F Variant: Hb F Viseu. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:e77-80.
 164. Ghotra S, Jangaard K, Pambrun C, et al. Congenital methemoglobinaemia due to Hb F-M-Fort Ripley in a preterm newborn. *BMJ Case Rep* 2016; 2016:bcr2016214381.
 165. Dainer E, Shell R, Miller R, et al. Neonatal cyanosis due to a novel fetal hemoglobin: Hb F-Circleville [Ggamma63 (E7)His \rightarrow Leu, CAT>CTT]. *Hemoglobin* 2008;32:596-600.
 166. Kumar MK, Judd C, Hoyer JD, et al. Hb Manukau [β 67(E11)Val \rightarrow Gly; HBB: c.203T>G]: the role of genetic testing in the diagnosis of idiopathic hemolytic anemia. *Hemoglobin* 2014;38:211-2.
 167. Giardine BM, Joly P, Pissard S, et al. Clinically relevant updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D1192-6.
 168. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory quality assurance committee. standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.