

## Variabilità delle frazioni emoglobiniche dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche e patologiche

Giovanni Ivaldi, Daniela Leone, Chiara Viaggi, Dino Pascotto

Laboratorio di Genetica, Settore Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

### ABSTRACT

**Variability of the hemoglobin fractions from birth to the adult age under physiological and pathological conditions.** Many investigations have been carried out in the past with the aim of determining the fractional concentrations of hemoglobin (Hb) A and Hb F in neonates. Neonatal identification and quantification of various hemoglobins may be required to confirm or to exclude formulated diagnosis during the fetal development, to predict serious disorders of globin chain synthesis, to identify an abnormality in a presymptomatic phase, to explain a hematological abnormality or to know the hemoglobin composition in relationship to the presence of remarkable clinical symptoms. We have determined at birth and in several ages during the switching from fetal to adult hemoglobin synthesis the percentages of Hb F, Hb A and Hb A2 in physiological conditions and in individuals with beta-thalassemia trait or Hb S, Hb C, Hb E or alpha Hb variants. More than 7000 subjects were examined by HPLC and in selected cases the hemoglobin fractions were also quantified by elution after cellulose acetate electrophoresis. Diagnoses were confirmed with biochemical or molecular methods as suggested by hemoglobinopathy guidelines.

### INTRODUZIONE

La diffusione di sistemi cromatografici automatici dedicati e precisi per la separazione e la determinazione delle frazioni emoglobiniche ha causato un aumento della domanda di esami anche da parte di specialisti, come i neonatologi e i genetisti, che si trovano spesso a dover interpretare o prevedere situazioni ematologiche complesse. La misura delle frazioni emoglobiniche presenti alla nascita, i cambiamenti ("*Hb switch*") nel periodo perinatale, il raggiungimento di valori percentuali stabili tra i sei e i dodici mesi di età oppure la variabilità di questi valori in presenza di possibili difetti dei geni globinici o di eventi sporadici ed occasionali possono essere facilmente e con precisione valutati mediante HPLC utilizzando sistemi più o meno evoluti messi a disposizione dall'industria (1).

L'interesse per una precoce valutazione dell'assetto emoglobinico da parte di neonatologi, pediatri, ematologi o genetisti spesso scaturisce dalla presenza di sintomi o sospetti clinici importanti come anemie ed emolisi, ma anche dalla necessità di dover confermare o escludere diagnosi formulate durante lo sviluppo fetale. Gli esami specifici per le emoglobinopatie possono essere richiesti anche per monitorare i soggetti "a rischio", nati da genitori portatori di difetti dell'emoglobina (Hb) e non esaminati in epoca prenatale.

Gli screening neonatali per le emoglobinopatie eseguiti nel passato tra le popolazioni dei paesi del Mediterraneo miravano soprattutto alla determinazione dell'Hb Bart's in relazione alla possibile presenza di  $\alpha$ -talassemia (2,3). Tale valutazione consentiva in qualche modo di ipotizzare la presenza di diverse forme in mancanza di più accurati esami diagnostici molecolari, mentre la biosintesi *in vitro*, utile per tali diagnosi, era alla por-

tata di solo pochi laboratori di riferimento. Lo screening alla nascita dell'Hb Bart's ha rappresentato quindi per molti anni un valido strumento di diagnosi indiretta dell' $\alpha$ -talassemia, ma è noto che questo tipo di difetto di sintesi delle catene globiniche non costituisce una condizione clinicamente rilevante, perlomeno nelle sue forme più lievi (4). A tutt'oggi, in molti stati degli Stati Uniti e in alcuni Paesi Africani viene eseguito alla nascita lo screening per l'Hb S mediante HPLC (4). Non sono invece mai stati eseguiti screening alla nascita per la ricerca di portatori di  $\beta$ -talassemia in quanto tale diagnosi si basa principalmente sulla valutazione dell'Hb A2 (5). La percentuale relativa di questa frazione minore dell'Hb, prodotta in quantità minima alla nascita e nei primi mesi di vita, può inoltre essere condizionata da numerosi fattori (6,7); alla nascita risulta, invece, più attendibile la misura dell'Hb A e dell'Hb F eseguita in HPLC, che può fornire precoci e importanti indicazioni anche sulla presenza di "trait"  $\beta$ -talassemici. In letteratura sono riportati pochi dati sulle percentuali relative dell'Hb A e dell'Hb F in condizioni fisiologiche alla nascita e durante i primi mesi di vita, ma soprattutto sono scarsi i dati in presenza di difetti talassemici o di frazioni "anomale" dell'Hb.

Nel corso degli ultimi quattro anni, nel nostro laboratorio sono stati esaminati numerosi neonati e bambini di età inferiore a due anni, nonché numerosi adulti, per la ricerca di difetti dell'Hb, talassemie e varianti Hb. In questo lavoro i risultati delle analisi sono stati raggruppati per gruppi omogenei di casistica, con particolare riferimento al periodo di età compreso dalla nascita fino ai due anni.

### MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati campioni di sangue raccolti in EDTA-K<sub>3</sub> ed analizzati lo stesso giorno del

prelievo o conservati a 4 °C per non più di 48 ore. Sono stati esaminati complessivamente 7.140 campioni, di cui 1.333 da neonati a cui è stato effettuato il prelievo a 24 ore dalla nascita. Per ogni soggetto studiato era ottenuto uno specifico consenso informato.

La separazione e quantificazione delle frazioni emoglobiniche è stata effettuata mediante HPLC con il sistema Variant II ( $\beta$  Thal Short Program, BioRad Laboratories). In presenza di Hb E, che coeluisce con l'Hb A2, il calcolo quantitativo delle rispettive frazioni è stato eseguito utilizzando la misura densitometrica a 413 nm delle diverse frazioni eluite dopo separazione elettroforetica su acetato di cellulosa a pH alcalino (8).

L'accertamento della  $\beta$ -talassemia eterozigote alla nascita o la caratterizzazione delle varianti Hb è stato sempre ottenuto mediante indagini molecolari o esami biochimici ed ematologici successivi, seguendo le indicazioni delle linee guida per le emoglobinopatie (8-10).

**RISULTATI E DISCUSSIONE**

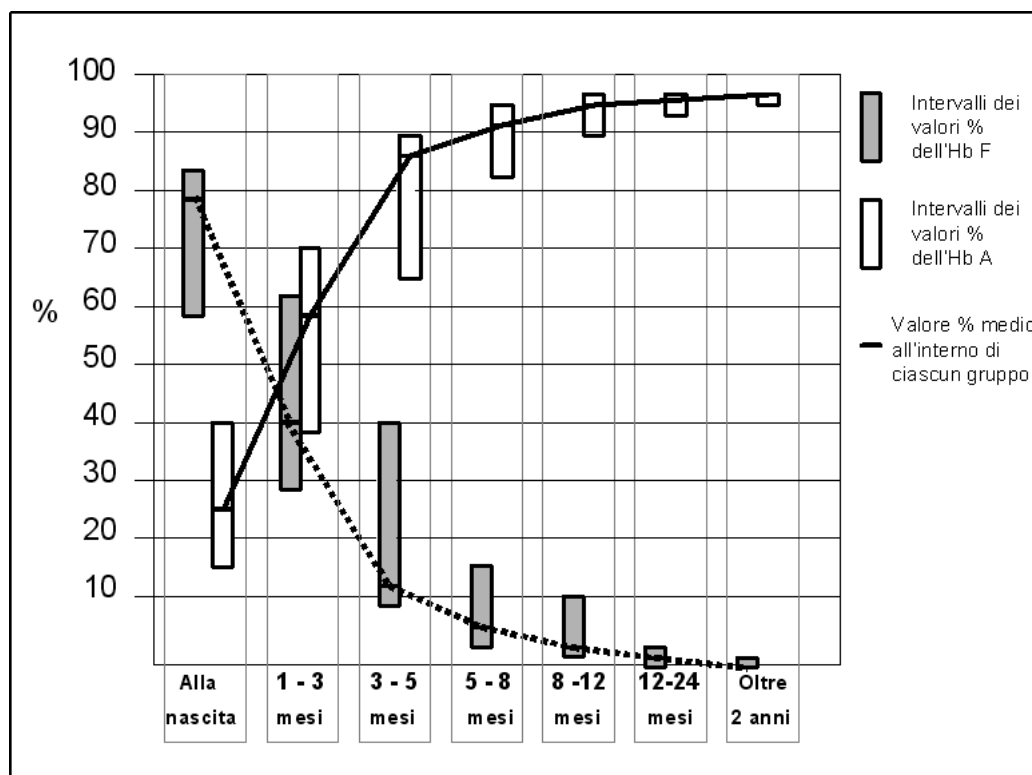
Nella Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti su oltre 5000 soggetti non portatori di difetti di sintesi o di struttura dell'Hb. Non è stato tuttavia possibile escludere che qualcuno di questi soggetti possa essere portatore non accertato di qualche forma di persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH). La Figura 1 riporta l'andamento degli assetti emoglobinici all'interno dei periodi di età considerati.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti negli oltre 800 soggetti risultati genericamente portatori eterozigoti di  $\beta$ -talassemia: i diversi tipi di difetto, silenti, beta+ e beta°, esprimono valori differenti di Hb A2 in età adulta ma anche l'Hb F (e conseguentemente anche l'Hb A) risulta sensibilmente diversa alla nascita. In questa Tabella non sono stati inseriti i soggetti portatori di difetti composti [portatori di  $\beta$ -talassemia associata altri difetti Hb ( $\alpha$ -talassemie,  $\delta$ - $\beta$ -talassemie, HPFH con elevata produzione di Hb F o varianti Hb)].

La Tabella 3 riporta la variabilità delle percentuali relative delle diverse frazioni Hb in presenza della

**Tabella 1**  
Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %
Alla nascita	1250	15 – 40	0 – 1	58 – 84
1 - 3 mesi	29	38 – 70	0,5 – 1,5	29 – 61
3 - 5 mesi	85	65 – 90	1,3 – 2,1	9 – 40
5 - 8 mesi	50	83 – 95	1,6 – 2,6	3 – 15
8 - 12 mesi	89	89 – 96	1,8 – 2,9	1 – 10
12 - 24 mesi	222	94 – 97	1,9 – 3,0	0,5 – 3,0
Oltre i 2 anni	3550	95 – 98	2,0 – 3,3	0,1 – 1,2



**Figura 1**  
Andamento medio di Hb F e Hb A nelle diverse classi di età.

variante più frequentemente riscontrata nella nostra popolazione, vale a dire l'Hb S. Tale Hb anomala è oggi maggiormente osservata proprio tra i neonati in ragione della crescente presenza di immigrati provenienti da aree geografiche particolarmente interessate dal difetto falcemico, analogamente a quanto accade per l'Hb C i cui valori sono riportati nella Tabella 4 e l'Hb E (Tabella 5).

**Tabella 2**

*Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di  $\beta$ -talassemia*

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %
Alla nascita	45	5 – 20	0 – 1,0	79 – 95
3 - 4 mesi	38	25 – 64	0,8 – 3,0	30 – 74
4 - 6 mesi	28	76 – 88	1,9 – 4,0	10 – 22
8 - 12 mesi	33	83 – 92	2,1 – 5,0	1 – 15
12 - 24 mesi	116	88 – 93	2,8 – 5,4	0,5 – 7
Oltre i 2 anni	550	92 – 95	2,9 – 6,1	0,1 – 4

La Tabella 6 riporta i valori delle componenti emoglobiniche in presenza delle quattro varianti delle catene  $\alpha$ -globiniche più ricorrenti (Hb Hasharon, Hb J Oxford, Hb J Sardegna e Hb O Padova). Tali varianti hanno caratteristiche diverse tra loro per quanto riguarda la loro affinità di legame con le catene omologhe ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). A questo proposito occorre considerare che le catene  $\alpha$ -globiniche sono impegnate a formare tetrameri oltre che con le catene  $\beta$  (Hb A) anche con le catene  $\gamma$  (Hb F) e le catene  $\delta$  (Hb A2); ciò vale per le catene  $\alpha$  normali ma anche per le catene  $\alpha$  mutate, per cui, oltre alle frazioni fisiologiche, in presenza di varianti delle catene  $\alpha$  dobbiamo attenderci dei composti ibridi diversi, spesso non ben separati e correttamente determinati. La seconda colonna della Tabella 6 riporta gli intervalli relativi all'Hb A2<sup>Normale</sup> ( $\alpha_2^N\delta_2^N$ ); i valori delle Hb A2<sup>X</sup> ( $\alpha_2^X\delta_2^N$ ), di solito inferiori alla componente normale, non sono stati considerati in quanto non sempre correttamente dosati. Analogamente anche i valori dell'Hb F non comprendono le possibili frazioni ibride dell'Hb F ( $\alpha_2^X\gamma_2^N$ ). Nella quarta colonna sono riportate le percentuali delle quattro varianti Hb in 51 soggetti, 27 dei quali portatori di Hb Hasharon. Occorre infine considerare che le varianti

**Tabella 3**

*Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di Hb S*

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %	Hb S %
Alla nascita	11	8 – 22	0 – 1,0	58 – 84	6 – 15
2 - 6 mesi	14	24 – 60	0,5 – 2,1	3 – 58	12 – 32
9 - 12 mesi	12	51 – 62	2,0 – 2,4	1 – 11	28 – 36
13 - 24 mesi	23	53 – 63	2,3 – 2,9	0,5 – 5,0	29 – 36
Oltre i 2 anni	78	56 – 66	2,5 – 3,2	0,1 – 1,8	30 – 44

**Tabella 4**

*Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di Hb C*

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %	Hb C %
Alla nascita	12	8 – 25	0 – 1,0	58 – 84	7 – 16
2 - 5 mesi	8	24 – 58	0,5 – 2,1	4 – 61	18 – 36
9 - 12 mesi	7	55 – 60	2,1 – 2,6	1 – 5	30 – 38
13 - 24 mesi	12	56 – 61	2,2 – 2,8	0,5 – 3,0	31 – 40
Oltre i 2 anni	21	58 – 64	2,4 – 3,2	0,1 – 1,2	32 – 44

**Tabella 5**

*Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di Hb E*

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %	Hb E %
Alla nascita	8	8 – 25	0 – 1,0	58 – 84	5 – 8
3 - 5 mesi	6	28 – 51	0,8 – 2,1	15 – 58	7 – 25
13 - 24 mesi	9	63 – 72	2,0 – 2,9	0,2 – 1,6	14 - 32
Oltre i 2 anni	12	66 – 77	2,4 – 3,2	0,1 – 5,0	15 - 36

**Tabella 6**

Variabilità delle tre principali frazioni dell'Hb in diversi periodi dalla nascita all'età adulta in soggetti portatori eterozigoti di Hb Hasharon, Hb J Oxford, Hb O Padova, Hb J Sardegna

Età	n	Hb A %	Hb A2 %	Hb F %	Varianti Hb alfa %
Alla nascita	7	12 – 25	0 – 0,7	58 – 84	3 – 8
3 - 5 mesi	4	38 – 55	0,5 – 1,8	15 – 54	5 - 15
6-8 mesi	8	60 – 74	0,9 – 2,1	2 – 18	7 - 20
Oltre i 2 anni	32	66 – 86	1,5 – 2,5	0,1 – 1,2	10 - 28

delle catene  $\alpha$  si esprimono rispetto alle varianti  $\beta$  in percentuale significativamente inferiore. Inoltre, la loro sintesi dipende dal gene che porta la mutazione ( $\alpha$ 2 o  $\alpha$ 1) (11). La percentuale di tutte le varianti,  $\beta$  o  $\alpha$ , dipende poi da eventuali difetti talassemici coereditati e ciò si esprimerà in ogni epoca dello sviluppo pre- e post-natale (12).

## CONCLUSIONI

I dati riportati in questo lavoro possono contribuire a fornire dei valori di riferimento ai laboratori che si occupano di diagnostica dei difetti dell'Hb. Anche i diversi specialisti clinici possono ritrovarvi informazioni utili sull'andamento e la variabilità percentuali delle diverse frazioni dell'Hb dalla nascita all'età adulta in condizioni fisiologiche o in presenza delle più frequenti emoglobinopatie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wild BJ, Stephens AD. The use of automated HPLC to detect and quantitate hemoglobins. *Clin Lab Haematology* 1997;19:171-6.
2. Galanello R, Diana G, Furbetta M, et al.  $\alpha$ -Thalassemia in Sardinian infants. *J Med Genet* 1980;17:357-62.
3. Sansone G, Sciarratta GV, Agosti S, et al. Geographic distribution and heterogeneity of Thalassemias in the Italian population. In: Cao A, Carcassi U, Rowley PT, eds. *Birth defects: Original articles series. March of Dimes Birth Defects Foundation* 1982;18:189-93.
4. Chapman C, Amos RJ, Henthorn JS, et al. Evaluation of methods for testing neonatal samples for disorders of haemoglobin synthesis. London: Medical Devices Agency, 1987.
5. The thalassaemia working party of the BCSH General Haematology Task Force: Guidelines for the investigation of the  $\alpha$  and  $\beta$  thalassaemia traits. *J Clin Pathol* 1994;47:289-95.
6. Alperin JB, Dow PA, Petteway MB. Hemoglobin A2 levels in health and various hematological disorders. *Am J Clin Pathol* 1972;67:219-26.
7. Kattamis C, Panayotis L, Metaxotou-Mavromati A, et al. Serum iron and unsaturated iron-binding-capacity in  $\beta$  thalassaemia trait: their relation to the levels of haemoglobins A, A2 and F. *Med Genetics* 1972;9:154-9.
8. International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for neonatal screening for haemoglobinopathies. *Clin Lab Haematology* 1988;10:335-45.
9. Working Party of the General Haematology Task Force of British Committee for Standards in Haematology. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 1998;101:783-92.
10. Traeger-Synodinos J, Old JM, Petrou M, et al. Best practice guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. EMQN, European Molecular Genetics Quality Network, 2002.
11. Molchanova TP, Pobedimskaya DD, Huisman THJ. The differences in quantities of  $\alpha$ 2- and  $\alpha$ 1-globin gene variants in heterozygotes. *Br J Haematol* 1994;88:300-6.
12. Huisman THJ. Combination of beta chain abnormal hemoglobins with each other or with beta-thalassaemia determinants with known mutations: influence on phenotype. *Clin Chem* 1997;43:1850-6.