

# Az áramlási citometria jelentősége a haemophagocytás lymphohistiocytosis diagnosztikájában egy fatális kimenetelű eset bemutatása kapcsán

Pállinger Éva dr.<sup>1</sup> ■ Erdélyi Dániel dr.<sup>2</sup> ■ Kovács Gábor dr.<sup>2</sup>  
 Kriván Gergely dr.<sup>3</sup> ■ Korponay Zsuzsanna dr.<sup>2</sup> ■ Fekete György dr.<sup>2</sup>  
 Szabó András dr.<sup>2</sup> ■ Falus András dr.<sup>1</sup> ■ Dérfalvi Beáta dr.<sup>2</sup>

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, <sup>1</sup>Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet,

<sup>2</sup>II. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>3</sup>Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház, Budapest

A haemophagocytás lymphohistiocytosis a citotoxikus T-lymphocyták és a természetes ölüsejtek kontrollálatlan aktiválódása és funkcionális zavara, illetve a következményes generalizált macrophagaktiváció miatt kialakuló extrém gyulladással társuló immunszabályozási zavar. Familiáris formájának hátterében a perforin fehérje működését, illetve exocytosisát érintő mutációk állnak. A szerzők egy fatális kimenetelű familiáris haemophagocytás lymphohistiocytosisban szenvedő csecsemő esetén keresztül kívánják bemutatni a funkcionális áramlási citometria jelentőségét. Meghatározták a természetes ölüsejtek és a citotoxikus T-lymphocyták perforintartalmát és ölüaktivitását, illetve a perforin szekréciójához nélkülözhetetlen LAMP1 fehérje (CD107a) *in vitro* stimulációt követő sejtfelszíni expresszióját. Betegüknél csökkent citotoxikus aktivitás és fokozott perforinexpresszió mellett csökkent CD107a-expressziót mutattak ki a lymphocytákon *in vitro* stimulációt követően, ami a perforinsekreció zavarára utalt. A későbbiekben elvégzett genetikai vizsgálat igazolta a diagnózist: a haemophagocytás lymphohistiocytosis 3-as típusával összefüggésben álló MUNC 13-4 gén mutációját. Az esetbemutatással a szerzők az áramlási citometria jelentőségére kívánják felhívni a figyelmet az immunsejtek funkcionális aktivitásának jellemzésében.  
 Orv. Hetil., 2014, 155(10), 389–395.

**Kulcsszavak:** haemophagocytás lymphohistiocytosis, áramlási citometria, macrophagaktiváció, primer immundeficiencia

## Flow cytometry in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis

Hemophagocytic lymphohistiocytosis is a multisystem inflammation, generated by the uncontrolled and excessive activation of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. Severe immunodeficiency and generalized macrophage activation can often be detected in the background of this life threatening disorder. It is classified as a primary immunodeficiency. Functional abnormalities of the perforin protein or defects in granule secretory mechanisms are caused by gene mutations in most cases. Diagnostic criteria of hemophagocytic lymphohistiocytosis are the following: fever, splenomegaly, cytopenias affecting at least two of the 3 lineages in peripheral blood, hypertriglyceridemia and hyperferritinemia, elevated serum level of soluble interleukin-2 receptor (sCD25), hypofibrinogenemia, hemophagocytosis in bone marrow and decreased cytotoxic T cell and natural killer cell activity. In this case report the authors summarize the utility of functional flow cytometry in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. Using flow cytometry, elevated intracellular perforin content, decreased killing activity of cytotoxic T cells and natural killer cells, and impaired cell surface expression of CD107a (LAMP1 protein) from *in vitro* stimulated blood lymphocytes were detected. Abnormal secretion of perforin was also demonstrated. Genetic testing revealed mutation of the MUNC 13-4 gene, which confirmed the base of the abnormal flow cytometric findings. This case report

demonstrates the value of functional flow cytometry in the rapid diagnosis of genetically determined hemophagocytic lymphohistiocytosis, a condition in which early diagnosis is critical for optimal management. The authors emphasize the significance of functional flow cytometry in the differential diagnosis of immunodeficiencies.

**Keywords:** hemophagocytic lymphohistiocytosis, flow cytometry, macrophage activation, primary immunodeficiency

Pállinger, É., Erdélyi, D., Kovács, G., Kriván, G., Korponay, Zs., Fekete, Gy., Szabó, A., Falus, A., Dérfalvi, B. [Flow cytometry in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis]. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(10), 389–395.

(Beérkezett: 2013. október 25.; elfogadva: 2013. november 17.)

### Rövidítések

HLH = haemophagocytás lymphohistiocytosis; IFN- $\alpha$  = interferon- $\alpha$ ; IL = interleukin; IVIG = intravénás immunglobulin; MTOC = mikrotubulusorganizációs centrum; NK = természetes ölüsejt; PI = propidium-jodid; pSMAC = perifériás szupramolekuláris aktivációs komplex; SLE = szisztémás lupus erythematosus; SNARE = soluble NSF attachment protein receptor; STX11 = syntaxin-11; Tc = citotoxikus T-sejt; TNF- $\alpha$  = tumornekrózis-faktor- $\alpha$ ; WASp = Wiskott–Aldrich-szindróma-fehérje

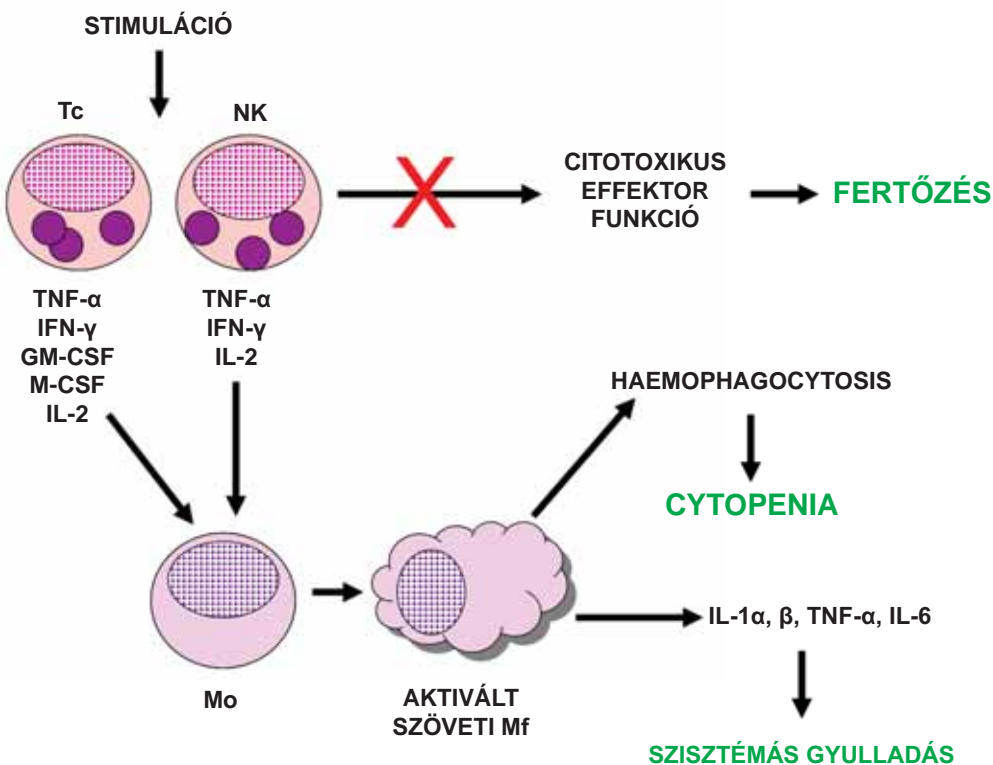
A haemophagocytás lymphohistiocytosis (HLH) súlyos, életet veszélyeztető megbetegedés, amelynek hátterében a citotoxikus T-sejt- (Tc-) válasz és a természetes ölüsejt (NK-sejt) aktivitás zavara áll. A kórkép jellegzetessége továbbá a Tc-sejtek túlzott proliferációja és ektópiás migrációja is. Mivel a citotoxikus sejtek effektor funkciója gátolt, a vírusfertőzés következtében kialakuló stimulációra csak fokozott citokintermeléssel tudnak válaszolni. Az általuk termelt citokinek, az IFN- $\gamma$ , a GM-CSF és az M-CSF szérumkoncentrációja megnő, ez pedig a szöveti histiocyták és macrophagok kontrollálatlan aktivációját eredményezi. A szöveti macrophag-aktiváció következménye egyrészt a pancytopeniában megnyilvánuló csontvelői haemophagocytosis, másrészt a fokozott interleukon-1 $\alpha$ - (IL-1 $\alpha$ -), IL-6- és a tumornekrózis-faktor- $\alpha$ - (TNF- $\alpha$ -) termelés következtében kialakuló szisztémás gyulladás és szöveti destrukció (1. ábra). Csecsemőkben, kisgyermekkorban észlelt tünetek esetén elsősorban a genetikailag meghatározott primer formákra kell gondolni. Veszélyes formái mellett a HLH azonban gyakran társul súlyos, krónikus megbetegedésekhez, autoimmun kórképekhez is, mint például a juvenilis idiopathiás arthritishoz vagy szisztémás lupus erythematosushoz (SLE). Ezen másodlagos formák klinikai manifestációjában is jelentős szerepet játszhatnak a vírusfertőzések. A gyermek- vagy felnőttkorban kialakuló, autoimmun vagy malignus megbetegedésekhez társult formákat gyakorta a macrophag-aktivációs szindróma elnevezéssel különböztetik meg [1, 2, 3, 4].

### A citotoxikus sejtválasz molekuláris mechanizmusa

A citotoxikus T-lymphocyták és az NK-sejtek az elpusztítandó célsejtek felismerését és az immunológiai szinapszis létrejöttét követően citotoxikus molekulákat, a pórusformáló perforint és szerinproteázokat (granzimokat) szecernálnak, amelyek révén apoptózist képesek indukálni a célsejtekben. A szigorúan kontrollált folyamat bármely ponton történő sérülése az effektor ölfunkció károsodásához és HLH/macrophag aktivációs szindróma kialakulásához vezet. A HLH molekuláris hátterének megértéséhez fontos a citotoxikus válaszreakció lépéseinek és szabályozásának pontos ismerete [5].

A citotoxikus válaszreakció molekuláris mechanizmusa:

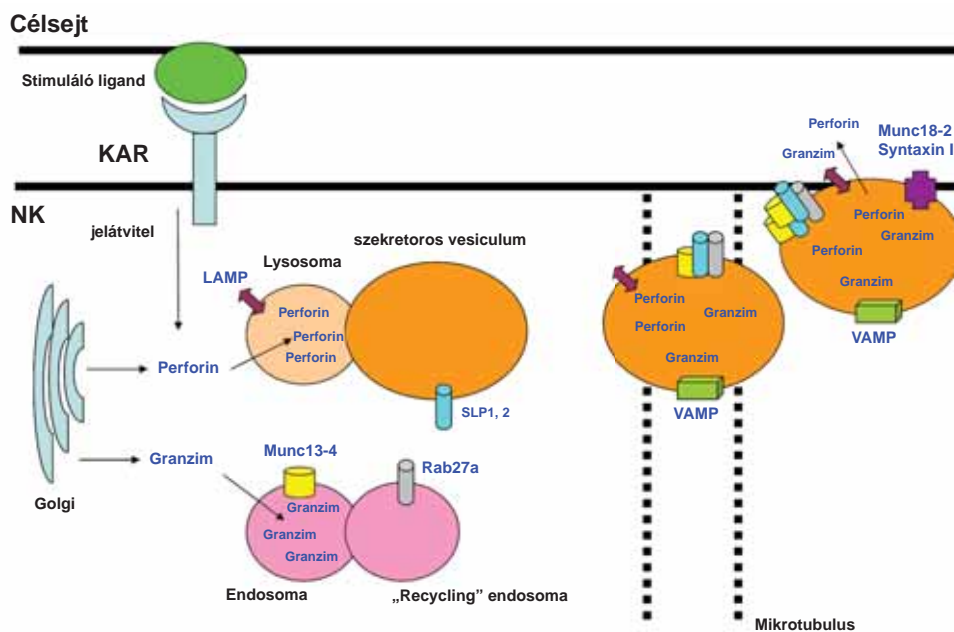
1. A célsejt felismerése a sejt felszíni receptorokon keresztül (TCR a Tc-sejteken; KAR/KIR az NK-sejteken).
2. Az immunológiai szinapszis kialakulása a citotoxikus sejtek és a célsejtek között. Az immunológiai szinapszis létrejötte során az intercelluláris adhézióban szerepet játszó receptorok átrendeződnek, megfigyelhető az aktin-citoskeleton rendszer reorganizációja, a perifériás szupramolekuláris aktivációs komplex (pSMAC) körül kialakul az úgynevezett F-aktin-gyűrű [6, 7]. Az aktinátrendezés szabályozásában többek között kiemelt szerepe van a Wiskott–Aldrich-szindróma-fehérjének (WASp) is [8].
3. A mikrotubulusorganizációs centrum (MTOC) átrendeződik és az immunológiai szinapszis felé irányul. Ez teszi lehetővé a szekréciós lysosomák szinapszis területéhez történő vándorlását, ami többek között a Cdc42 fehérjék által szabályozott folyamat [9].
4. Az MTOC által a sejtmembránhoz irányított vesiculumok rögzülnek a szinapszis területén (dokkolás). A dokkolást a Rab GTPázok és a Munc fehérjék szabályozzák [10].
5. A rögzült vesiculumok összeolvadnak a sejtmembránnal és lyticus fehérjeiket (perforin és granzimok) az intercelluláris térbe ürítik [11]. A membránfúzió regulációja a SNARE (Soluble NSF Attachment



1. ábra

A macrophagaktivációs szindróma patomechanizmusa

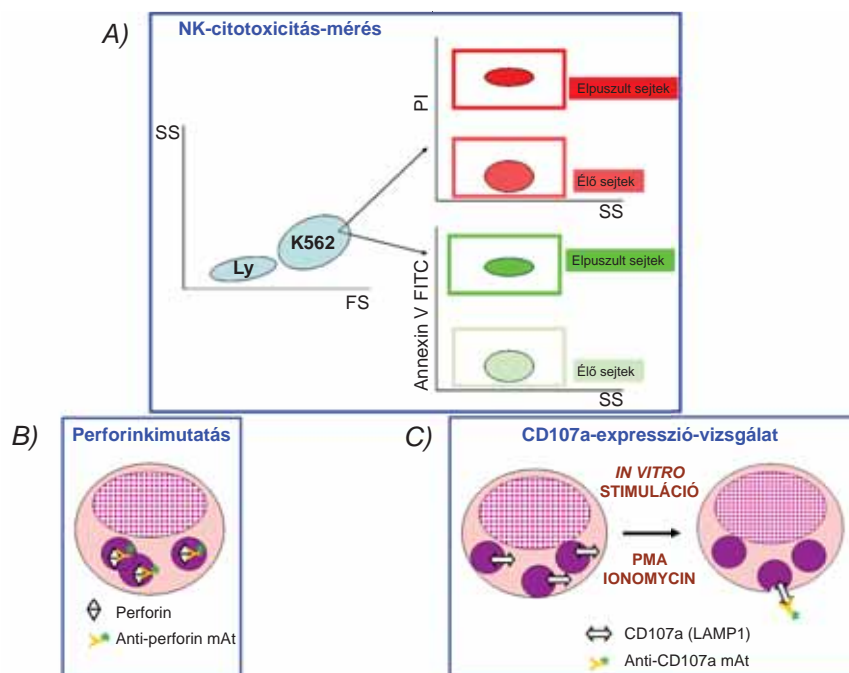
A citotoxikus effektor sejtek működési zavaruk miatt vírusfertőzésre fokozott citokintermeléssel válaszolnak. Az általuk termelt citokinek a szöveti macrophagok kontrollálatlan aktivációját, szisztémás gyulladást és szöveti destruktíót eredményeznek



2. ábra

A citotoxikus granulumok exocytosisának molekuláris mechanizmusa

A citotoxikus T-lymphocyták és az NK-sejtek a receptor–ligand interakción keresztül történő stimulációja a perforin- és a granzimtartalmú vesiculumok degranulációjához vezet. A citotoxikus granulumok „hibrid vesiculumoknak” tekinthetők, mert a lysosomák és a késői endosomák összeolvadása révén keletkeznek. A granzimok a trans-Golgi hálózatból a korai endosomákba kerülnek, míg a perforin a lysosomákba jut. A lysosoma és a késői endosomák fúziója után jönnek létre a szekretoros vesiculumok, amelyek az MTOC átrendeződése révén az immunológiai szinapszis területére vándorolnak és fuzionálnak a sejtmembránnal. A granzimok eredetileg a korai endosomákba jutnak, majd innen kerülnek át azokba az úgynevezett „recycling” vesiculumokba, amelyek a membrántól térnek vissza a citoplazmába. Ez „recycling” vesiculum expresszálja azokat a fehérjéket, például Munc13-4, Rab27a, amelyek a dokkoláshoz, vagyis a sejtmembránhoz történő kikötődéshez szükségesek. A dokkoláshoz számos fehérje–fehérje interakció szükséges: mint például a Rab27a–SLP1/SLP2 vagy a Munc18-2–szintaxin-11



3. ábra

A HLH FACS-diagnosztikája

A) A sejt közvetítette citotoxicitás FACS-módszerrel történő meghatározása

A lymphocyták K562 erythroleukaemiasejtekkel szembeni citotoxikus aktivitása az apoptózissal elpusztított célsejtek százalékos arányának detektálásával adható meg. Az apoptózissal elpusztult sejtek annexin-V- és propidium-jodid- (PI-) festéssel azonosíthatók. Az apoptózis korai fázisában a plazmamembrán lipidösszetétele megváltozik, a külső membránréteg foszfatidiliszterinben gazdaggá válik. Az annexin-V a foszfatidiliszterin-molekulákhoz kötődve alkalmas az apoptotizált sejtek detektálására, vagyis az elpusztult sejtek a FACS-mérés során mint annexin-V+ sejtek jelennek meg. A kettős szálú DNS-hez kötődő PI számára az élő sejtek membránja átjárhatatlan, így a FACS-mérés során azok a sejtek jelölődnek a festékkel, amelyek membránja az apoptózis miatt már károsodott

B) Lymphocyták perforintartalmának kimutatása

Az intracelluláris jelölés során a lymphocyták 4%-os paraformaldehides fixálás és 0,1%-os szaponinoldattal történő permeabilizálás után monoklonális antihumán perforin-ellenanyaggal vannak megfestve

C) CD107-mobilizáció vizsgálata áramlási citométerrel

A lysosomák membránjában elhelyezkedő LAMP-fehérjék (CD107a, CD107b) jelenléte nyugvó sejtek esetében csak intracelluláris jelölést követően detektálható, hiszen a plazmamembránban nem expresszálódnak. A sejtaktivációt követő degranuláció során a lyticus granulomok membránja összeolvad a sejtmembránnal, ezért a lysosomaasszociált fehérjék megjelennek a sejt felszínen és sejt felszíni immunfenotípzálással kimutathatók válnak

Protein Receptor) fehérjék és a szintaxinok révén válnak meg [12].

6. A direkt citotoxicitás a célsejt membránjában a perforin által kialakított póruson keresztül sejtbe jutott granzimok hatására megy végbe, amelyek a kaszpázrendszer aktiválása révén apoptózist indukálnak [13] (2. ábra).

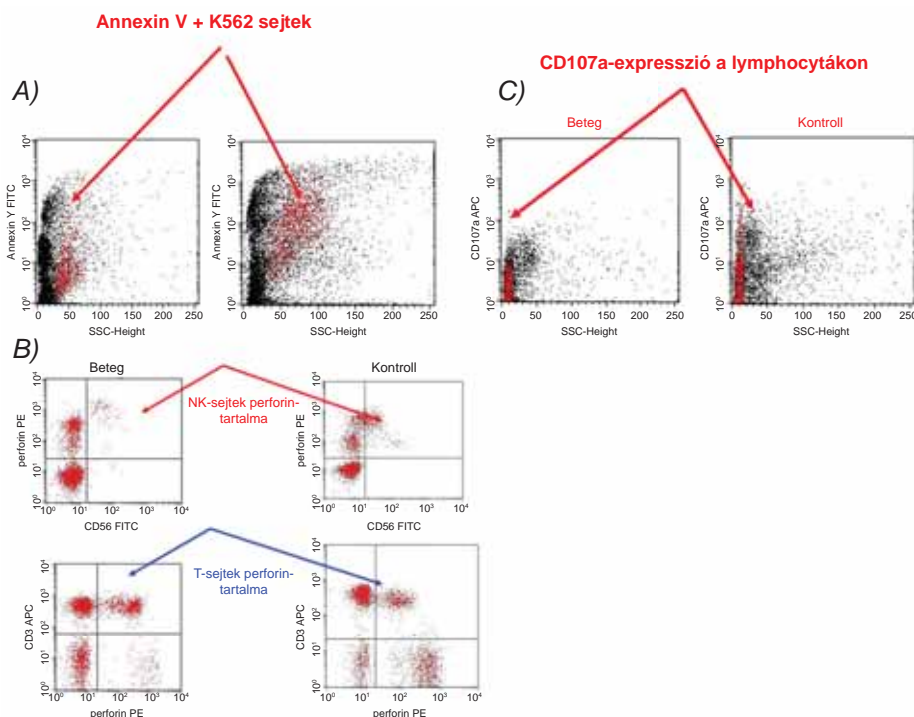
A HLH primer formája autoszomális, recesszíven öröklődő megbetegedés, amelynek 5 altípusa különböztethető meg a károsodott gének szerint. Az I. típus háttere jelenleg még ismeretlen, a II. típus a perforin gén (PRF1), a III. a Munc13-4 dokkolófehérje (UNC13D), a IV. a syntaxin-11 (STX11) és az V. a Munc18-2 (STXB2) mutációja miatt alakul ki [1]. Ismertek olyan primer immundefektusok is, amelyek a citotoxikus immunválasz károsodásán keresztül ugyancsak a HLH klinikai képében jelentkeznek. Ilyenek például a Chédiak-Higashi-szindróma, amelynek hátterében a lysosomák vándorlását szabályozó fehérjék génjének (LYST) mutációja áll [14], a mutáns Rab27 fehérje által okozott Griscelli-szindróma [15], a SAP, illetve a XIAP fehérjék

működésének hiánya/zavara révén kialakuló I. és II. típusú X-kromoszómához kötött immunhiányos állapot (XLP-1; XLP-2) [16, 17] vagy az adaptor fehérje 3 komplex (AP-3) károsodásával összefüggő Hermansky-Pudlak-szindróma [18]. A betegség szerzett formáival elsősorban autoimmun gyulladásokban és malignus betegségekben lehet találkozni [19].

## A HLH diagnosztikája

A diagnózist a klinikai kép és a sajátos laboratóriumi eltérések alapozzák meg. A betegség diagnosztikus kritériumai közé tartozik a láz, a splenomegalia, a legalább 2 sejtvonalat érintő cytopenia, a hypertriglyceridaemia ( $\geq 3$  mmol/l), a hypofibrinogenaemia ( $< 1,5$  g/l) és hyperferritinaemia ( $\geq 500$   $\mu$ g/l), a szolúbilis CD25 (IL-2R $\alpha$ -lánc) koncentrációjának emelkedése ( $\geq 2400$  U/ml), a csontvelői haemophagocytosis és a csökkent vagy hiányzó NK-sejt-aktivitás. A kórképet kiegészíthetik a krónikus perzisztáló hepatitis tünetei, beleértve a jellegzetes szövettani képet és laboratóriumi paramétere-





4. ábra

FHLH bizonyítása FACS-módszerrel

- A) A citotoxikus aktivitás jellemzését a K562 erythroleukaemiasejtekkel szembeni ölképeség detektálásával végeztük. A vizsgálat során a beteg és az életkorban illesztett egészséges kontroll perifériás mononukleáris sejteit K562 célsejtekkel inkubáltuk együtt, 2 órán keresztül. Az inkubációs idő végén az apoptotizált K562 sejteket az annexin V-festődésük alapján azonosítottuk. Összehasonlítva az életkorban illesztett egészséges kontrollal, a beteg NK-sejtjei körülbelül 20%-kal kevesebb K562 célsejtet tudtak elpusztítani
- B) A perforin jelenlétének kimutatására CD56 FITC/intracelluláris perforin Pe/CD3 APC-festést végeztünk. A Tc-sejteket a CD3+/CD56- immunfenotípus alapján azonosítottuk. (Mivel a CD4+ Th-sejtek nem expresszálnak perforint, ezért a CD3+ kapun belül detektált perforin a Tc-sejtekből származik.) Az NK-sejteket a CD3-/CD56+ immunfenotípussal definiáltuk. Összehasonlítva az életkorban illesztett egészséges kontrollal, a beteg T-lymphocytáiban és NK-sejtjeiben magasabb perforinexpressziót detektáltunk
- C) CD107a extracelluláris megjelenésének kimutatása *in vitro* stimulációt (K562 erythroleukaemiasejtek+PMA/Ca++ ionofor) követően. A beteg lymphocytáinak felszínén *in vitro* stimulációt követően nem jelent meg a CD107a, míg a kontroll-lymphocyták egy részének felszínén kimutathatóvá vált

ket: a magas transzaminázértékeket, a magas szérumbilirubin-szintet, a VLDL-koncentráció emelkedettségét és az LDH-koncentráció csökkenését. Egyes esetekben cerebromeningealis tünetek is észlelhetők: a liquorban pleocytosis (mononukleáris sejtek) és/vagy emelkedett fehérjekoncentráció detektálható. A diagnózis felállításához a fenti kritériumok közül legalább 5-nek teljesülnie kell [1].

Bár a klinikai tünetegyüttes és a speciális laboratóriumi eltérések általában lehetővé teszik a diagnózis felállítását, a detektálható paraméterek aspecificitása miatt szükséges lehet konkrétan, a kórképet bizonyítani képes módszerek beállítása is.

Munkacsoportunk áramlási citométerrel detektálta a betegség hátterében álló citotoxikus T-lymphocyták és NK-sejtek funkcionális aktivitását. Vizsgálatainkkal specifikusan igazolni tudtuk a Tc- és NK-sejtek működésének zavarát, sőt sikerült bizonyítanunk a funkciózavar okát is, amely nemcsak alátámasztotta az FHLH fennállását, hanem a kórkép pontos klasszifikációját is lehetővé tette. Esetbemutatásunkkal arra szeretnénk felhívni a figyelmet, hogy az immunsejtek funkcionális aktivitásának jellemzése kiemelten fontos az immuniá-

nyos állapotok differenciáldiagnosztikájában. Az áramlási citometria gyors és specifikus vizsgálati módszer, ezért nagyon jól használható az ilyen típusú vizsgálatok elvégzésére. Javasoljuk a diagnosztikus lépcsősorba állítását.

### A HLH FACS-diagnosztikája (3. ábra)

#### Az NK-sejtek és citotoxikus T-lymphocyták ölképeségének funkcionális vizsgálata FACS-módszerrel

A sejt közvetítette citotoxicitás meghatározása célsejtek alkalmazásával lehetséges. Az aktivitás mértéke az elpusztított célsejtek százalékos arányával adható meg. Általánosan elfogadott target a K562 erythroleukaemiasejtvonal. A vizsgálat során a sűrűséggradiens centrifugálással izolált perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) 37 Celsius-fokon, 2 órán keresztül kell együtt inkubálni a célsejtekkel. Az inkubációs idő letelte után az apoptotizált elpusztult sejtek annexin-V- és propidium-jodid- (PI-) festéssel detektálhatók. Tekintettel arra, hogy laboratóriumi referenciatartományok nem

állnak rendelkezésre a funkcionális vizsgálatok többségében, az eredmények értékeléséhez általánosan elfogadott az életkorban illetett egészséges kontrollnortól származó minták vizsgálata [20].

### *A Tc-sejtek és az NK-sejtek perforintartalmának vizsgálata többszínű immunfenotípiával*

A perforintartalom mérése a fixált és permeabilizált PBMC-sejtek monoklonális antihumán perforin-ellenanyaggal történő jelölése révén lehetséges. A citotoxikus T-lymphocyták és az NK-sejtek elkülöníthetősége érdekében a citoplazmatikus jelölést megelőzően sejtfelszíni CD3-, CD8- és CD56-jelölést ajánlatos végezni. Az NK-sejtek a CD3-/CD56+ immunfenotípus alapján, a Tc-sejtek a CD3+/CD8+ immunfenotípus alapján azonosíthatók [21].

### *Funkcionális NK-degranuláció (CD107 mobilizáció) vizsgálata FACS-módszerrel*

A lysosomaasszociált fehérjék (LAMP1 = CD107a, LAMP2 = CD107b) a lysosomák külső membránjában elhelyezkedő glikoproteinek, amelyek jelenléte nem detektálható a nyugvó NK-sejtek plazmamembránjában. Az NK-sejtek aktivációja exocytosissal jár, azaz a sejtmembránhoz vándorolt lyticus granulumok az extracelluláris térbe ürítik tartalmukat. A lysosomák és a sejtmembrán összeolvadása miatt a LAMP fehérjék a plazmamembrán külső felszínére kerülnek és CD107a-specifikus monoklonális ellenanyagokkal kimutathatók [22].

## Esetismertetés

2012 februárjában tartós láz miatt egy 2 hónapos csecsemőt vettünk fel a Semmelweis Egyetem II. Gyermek-klinikájára. A csecsemő második gyermekként, panaszmentes terhesség után, természetes úton, 4040 g testsúllyal, Apgar 10/10 statusban született, a 38. gesztációs héten. A zavartalan perinatalis szakot követően jól fejlődött. A családi anamnézisben nem voltak terhelő adatok: immunhiány, csecsemő-, illetve gyermekori halál, infekciós eredetű halál nem volt ismert. A szülők nem vérrokonok.

Hathetes korban ultrahangszűrés során hepatosplenomegaliára derült fény. Ezt követően két hónapos korban vírusinfekció okozta bronchiolitis után tartós láz maradt vissza. A fertőzések hátterének felderítésére végzett vírusszelológiai vizsgálatok (adenovírus, cytomegalovírus, Epstein-Barr-vírus), illetve az Epstein-Barr-vírus-PCR-vizsgálat nem tudták a fertőzés okát azonosítani. A csecsemő statusából kiemelendő a maculosus erythema, a perzisztáló hepatosplenomegalia (4–4 cm) és a shubokban jelentkező irritabilitás. A gyermek haja

normálisan pigmentált volt, amit a Griscelli-szindróma kizárása miatt tartunk fontosnak megemlíteni. A laboratóriumi értékek a macrophagaktivációs szindróma jellegzetességeit mutatták: hypertriglyceridaemiát (9,8 mmol/l), magas ferritinszintet (4428 ng/ml), progresszív pancytopeniát (thrombocyta 18 G/l, fehérvérsejt: 1,7 G/l, abszolút neutrophil granulocyt: 0,15 G/l, vörösvértest 2,44 T/l) és csontvelői haemophagocytosis. További leletek: emelkedett GGT- (922 U/l) és LDH- (861 U/l) koncentráció, emelkedett D-dimerkoncentráció (1,47 µg/ml), alacsony CRP- és procalcitoninértékek. A Chediak-Higashi-szindrómára jellemző óriásgranulumok jelenléte a granulocytákban nem volt kimutatható.

A szisztémás és szervspecifikus gyulladások (hepatitis, ultrahangvizsgálattal igazolt ascites, pleuritis) és a haemophagocytosis ugyancsak a macrophagaktivációs szindróma lehetőségére utaltak. Mivel a beteg kiscsecsemő volt, elsősorban az örökletes formák, a familiáris haemophagocytosis lymphohistiocytosis különböző típusai kerültek szóba.

### *A diagnózis igazolása áramlási citometriával*

A diagnózis igazolásához FACS-módszerrel meghatároztuk az NK-sejtek és a citotoxikus T-lymphocyták öloaktivitását, a lymphocyták perforintartalmát és a perforin szekréciójához nélkülözhetetlen LAMP1 fehérje (CD107a) *in vitro* stimulációt követő felszíni expresszióját is. Az eredmények csökkent citotoxikus aktivitás és fokozott perforinexpresszió mellett, *in vitro* stimulációt követően csökkent CD107a-expressziót igazoltak a lymphocytákon, ami a perforinszekréció zavarát bizonyította (4. ábra).

### *Genetikai vizsgálatok*

A Franciaországban (Geneviève de Saint Basile, Hôpital Necker Enfants Malades-Unité INSERM, Párizs) elvégzett genetikai vizsgálat (UNC 13D Munc 13-4 gén szekvenálása) teljes mértékben alátámasztotta a FACS-módszerrel felállított diagnózist: az FHL 3-as típusával összefüggésben álló mutációkat igazolt (a 17q25.1 lokalizációban a MUNC13D gén heterozigóta GGAG-deletiója a 24. exonban az édesanyánál, és az 1. intron 118–308C>T heterozigóta mutációja az édesapánál). Az édesanyánál talált mutációt a beteg csecsemő genomjában is ki lehetett mutatni, az édesapánál észlelt mutáció tesztelésére már nem volt lehetőség.

### *Terápia*

A csecsemő a HLH-94/HLH 2004 protokollok alapján adott dexamethason- és etopozidkezelés, továbbá nagy dóziszú iv. immunglobulin (2 g/l) mellett átmene-

tileg jobban lett. Láztalanná vált, irritabilitása megszűnt, kiütései eltűntek, hepatosplenomegáliája lényegesen mérséklődött. A vérképzés mindhárom vonalán rapid emelkedés volt látható. A kemoterápia másfél hónap utáni protokoll szerinti intenzitáscsökkentése után betegsége a macrophagaktivációs szindróma tipikus klinikai és laboratóriumi tüneteivel újra fellángolt, ami miatt cyclosporin-A-terápiát, megemelt szteroid- és ismételt intravénás immunglobulin- (IVIG-) kezelést kapott.

Fludarabin-, melphalan-, MabCampath-kondicionálás után HLA-identikus testvérétől vérképző őssejt-transzplantáció történt. Ezt követően betegünk májelégtelenség, cellulitis talaján kialakult szepszis miatt plazmaferézisen esett át, és granulocytatranszfúziókat kapott. Az alkalmazott terápiás eljárások ellenére betegünket szepszisben elvesztettük.

## Következtetések

Esetbemutatásunkkal arra szeretnénk felhívni a figyelmet, hogy az áramlási citometria gyorsasága és specifitása révén nagyon jól használható az immunsejtek funkcionális állapotának felmérésére és jellemzésére. A jól megválasztott funkcionális vizsgálatokkal a ritka immunhiányos kórképek nemcsak diagnosztizálhatók, hanem klasszifikálhatók is lehetnek. Munkacsoportunk ezért kiemelten javasolja a funkcionális FACS-mérések diagnosztikus lépcsősorba állítását az immunhiányos állapotok differenciáldiagnosztikájában.

Jelen esetbemutatás kapcsán munkacsoportunk a HLH FACS-diagnosztikájához a következő vizsgálati protokollt javasolja:

1. Az NK-sejtek és citotoxikus T-lymphocyták ölöaktivitásának funkcionális jellemzése K562 célsejtekkel szemben.
2. Az NK-sejtek és citotoxikus T-lymphocyták perforintartalmának detektálása többszínű festéssel.
3. A degranuláció folyamatának jellemzése a CD107a sejtfelszíni expressziójának *in vitro* stimulációt követő kimutatása révén.

## Irodalom

- [1] Janka, G. E.: Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu. Rev. Med.*, 2012, 63, 233–246.
- [2] Janka, G., zur Stadt, U.: Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2005, 2005, 82–88.
- [3] Rieux-Laucat, F., Magerus-Chatinet, A.: Autoimmune lymphoproliferative syndrome: a multifactorial disorder. *Haematologica*, 2010, 95, 1805–1807.
- [4] Larroche, C., Mouthon, L.: Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). *Autoimmun. Rev.*, 2004, 3, 69–75.
- [5] De Saint Basile, G., Ménasché, G., Fischer, A.: Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10, 568–579.
- [6] Davis, D. M., Dustin, M. L.: What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.*, 2004, 25, 323–327.
- [7] Griffiths, G. M., Tsun, A., Stinchcombe, J. C.: The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.*, 2010, 189, 399–406.
- [8] Ochs, H. D., Notarangelo, L. D.: Structure and function of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Curr. Opin. Hematol.*, 2005, 12, 284–291.
- [9] Pulecio, J., Petrovic, J., Prete, F., et al.: Cdc42-mediated MTOC polarization in dendritic cells controls targeted delivery of cytokines at the immune synapse. *J. Exp. Med.*, 2010, 207, 2719–2732.
- [10] Elstak, E. D., Neeft, M., Nehme, N. T., et al.: Munc13-4\*rab27 complex tethers secretory lysosomes at the plasma membrane. *Commun. Integr. Biol.*, 2012, 5, 64–67.
- [11] Topham, N. J., Hewitt, E. W.: Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 2009, 128, 7–15.
- [12] Jena, B. P.: Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv. Exp. Med Biol.*, 2011, 713, 13–32.
- [13] Chowdhury, D., Lieberman, J.: Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, 26, 389–420.
- [14] Kaplan, J., De Domenico, I., Ward, D. M.: Chediak-Higashi syndrome. *Curr. Opin. Hematol.*, 2008, 15, 22–29.
- [15] Ménasché, G., Fischer, A., de Saint Basile, G.: Griscelli syndrome types 1 and 2. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 71, 1237–1238.
- [16] Dong, Z., Veillette, A.: How do SAP family deficiencies compromise immunity? *Trends Immunol.*, 2010, 31, 295–302.
- [17] Rigaud, S., Fondanèche, M. C., Lambert, N., et al.: XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 2006, 444, 110–114.
- [18] Hurford, M. T., Sebastiano, C.: Hermansky-Pudlak syndrome: report of a case and review of the literature. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2008, 1, 550–554.
- [19] Grom, A. A., Villanueva, J., Lee, S., et al.: Natural killer cell dysfunction in patients with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *J. Pediatr.*, 2003, 142, 292–296.
- [20] <http://www.cyto.purdue.edu/archive/flowcyt/research/cytotech/amfc/data/page12.htm>
- [21] Hersperger, A. R., Makedonas, G., Betts, M. R.: Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A*, 2008, 73, 1050–1057.
- [22] Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., et al.: Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.*, 2009, 254, 149–154.

(Pállinger Éva dr.,  
Budapest, Nagyvárad tér 4., 1089  
e-mail: eva.pallinger@gmail.com)