

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/ Review

Limfohistiocytoza hemofagocytarna u dzieci

Hemophagocytic lymphohistiocytosis in children



Magdalena Wołowiec, Iwona Malinowska*

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Kierownik kliniki: Prof. dr. hab. Michał Matysiak, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 16.06.2016

Zaakceptowano: 04.10.2016

Dostępne online: 13.10.2016

Słowa kluczowe:

- limfohistiocytoza hemofagocytarna
- HLH
- cytotoxycytność
- degranulacja
- komórki NK
- perforyna

Keywords:

- Hemophagocytic lymphohistiocytosis
- HLH
- Cytotoxicity
- Degranulation
- NK cells
- Perforin

ABSTRACT

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a heterogenic syndrome characterized by an acute, life-threatening inflammation due to a highly stimulated but ineffective immune response. Depending on the etiology, HLH is divided into primary (genetic) and secondary (acquired) forms. Primary HLH can be divided into familial HLH and HLH associated with other genetic disorders. Secondary HLH usually occurs in the context of a severe infection, rheumatic disease, or malignancy. HLH in children is a rare condition characterized by nonspecific symptoms and poor prognosis. Novel diagnostic tools and therapeutic methods give hope to improve the survival of the patients.

© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Żwirki i Wigury 63a, 02-091 Warszawa, Polska. Tel.: +48 22 3179619.

Adres email: iwona.malinowska@wum.edu.pl (I. Malinowska).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.10.001>

0001-5814/© 2016 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Wprowadzenie

Histiocytozy to zróżnicowana grupa rzadkich chorób charakteryzujących się nadmiernym gromadzeniem makrofagów, komórek dendrytycznych lub komórek pochodzących z monocytów (*monocyte-derived cells*) w różnych tkankach i narządach [1]. W 2016 roku Histiocyte Society zaproponowało nową klasyfikację histiocytoz i nowotworów wywodzących się z linii makrofagów i komórek dendrytycznych w oparciu o zróżnicowany przebieg kliniczny, obraz histologiczny, fenotyp oraz wyniki badań genetycznych i molekularnych [2]. Aktualna klasyfikacja histiocytoz obejmuje 5 grup [2]:

- 1) Grupa „L” (*Langerhans*)
- 2) Grupa „C” (*Cutaneous and muco-cutaneous histiocytoses*)
- 3) Grupa „M” (*Malignant histiocytoses*)
- 4) Grupa „R” (*Rosai-Dorfman*)
- 5) Grupa „H” (*Haemophagocytic lymphohistiocytosis*) – HLH oraz zespół aktywacji makrofagów (*macrophage activation syndrome; MAS*)

Limfohistiocytoza hemofagocytarna i zespół aktywacji makrofagów należą do grupy H.

Szczegółowy podział histiocytoz z grupy H przedstawiono w tabeli I.

Pierwszy opis HLH opublikowano w 1952 r. pod nazwą rodzinnej hemofagocytarnej retikulozy (*familial hemophagocytic reticulosis*) [3]. W następnych latach pojawiały się kolejne doniesienia o rodzinnych i sporadycznych przypadkach choroby. Choć choroba ta występuje rzadko, z uwagi na nie w pełni wyjaśnioną patofizjologię budzi duże zainteresowanie badaczy [4].

Wrodzona postać HLH występuje głównie dzieci. W większości przypadków choroba ujawnia się w 1. półroczu życia [5], jednak w miarę coraz szerszego zastosowania genetycznych metod diagnostycznych przypadki FHL rozpoznawane są również w późniejszym wieku (*late onset HLH*), w tym u osób dorosłych [6–8]. Według danych z piśmiennictwa, zapadalność na HLH u dzieci wynosi 1/50 000 [9].

Brak jest danych dotyczących częstości występowania HLH w Polsce, prawdopodobnie zespół ten rozpoznawany jest w naszym kraju rzadziej niż w krajach Europy Zachodniej i duża liczba przypadków pozostaje niezdiagnozowana. Najczęściej stwierdzaną przyczyną rodzinnej postaci HLH u dzieci w Polsce jest mutacja genu *UNC13D* (*FHL3*) [10].

HLH jest zespołem klinicznym, który może być wywołany różnymi czynnikami przyczynowymi. W zależności od etiologii, HLH dzieli się na postaci pierwotne (genetyczne) i wtórne (nabyte) [4].

Pierwotne HLH

Wśród postaci pierwotnych (genetycznych) wyróżnia się rodzinne HLH (*familial HLH*; *FHL*) oraz postaci występujące we wrodzonych zespołach niedoborów immunologicznych i zaburzeń przebiegu reakcji zapalnej [11–17]. Rodzinne HLH są dziedziczone autosomalnie recesywnie i związane są z występowaniem mutacji w genach kodujących białka niezbędne dla cytotoxyczności limfocytów – *PRF1* (*FHL2*),

**Tabela I – Histiocytozy z grupy H wg Histiocyte Society [2]
Table I – Histiocytosis of H group by Histiocyte Society [2]**

Pierwotne HLH: genetyczne przyczyny prowadzące do rozwoju HLH

HLH związane z defektem cytotoxyczności limfocytów
FHL2 (*PRF1*)
FHL3 (*UNC13D*)
FHL4 (*STXBP2*)
FHL5 (*STXBP2*)
XLP1 (*SH2D1A*)
 Zespół Griscellego typ 2 (*RAB27A*)
 Zespół Chediaka-Higashi'ego (*LYST*)
 HLH związane z zaburzeniami aktywacji inflamasomów
XLP2 (*BIRC4*)
NLR4
 HLH związane z określonymi genetycznymi zaburzeniami przebiegu reakcji zapalnej
 Lizynuryczna nietolerancja białek (*SLC7A7*)
HMOX1
 Inne określone genetyczne zaburzenia przebiegu reakcji zapalnej
 Rodzinne HLH nieznanego pochodzenia

Wtórne HLH (nieuwarunkowane genetycznie)

HLH w przebiegu infekcji
 HLH w przebiegu infekcji wirusowej
 HLH w przebiegu infekcji bakteryjnej
 HLH w przebiegu infekcji pasożytniczej
 HLH w przebiegu infekcji grzybiczej
 HLH w przebiegu choroby nowotworowej
 HLH wyindukowane przez nowotwór (HLH przy rozpoznaniu choroby nowotworowej)
 HLH występujące w trakcie chemioterapii
 HLH związane z chorobą nowotworową, bliżej nieokreślone
 HLH związane z chorobą reumatyczną – zespół aktywacji makrofagów (*macrophage activation syndrome; MAS*), *MAS-HLH*
 HLH w przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów o początku układowym
 HLH w przebiegu choroby Stilla
 HLH związane z toczniem układowym
 HLH związane z układowym zapaleniem naczyń
 HLH związane z innymi określonymi chorobami autoimmunologicznymi
 HLH związane z nieokreślonymi chorobami autoimmunologicznymi
 HLH związane z transplantacją
 HLH w przebiegu jatrogennej aktywacji układu immunologicznego
 HLH w przebiegu jatrogennej supresji układu immunologicznego
 HLH w przebiegu innych neuwarunkowanych genetycznie chorób
 HLH nieznanego/niepełnego pochodzenia

UNC13D (*FHL3*), *STX11* (*FHL4*) i *STXBP2* (*FHL5*) [18–21]. Charakterystykę rodzinnych HLH przedstawiono w tabeli II.

W ostatnim czasie w literaturze pojawiły się opisy nowych mutacji związanych z rozwojem HLH.

Mutacja *NLR4* (*NOD-like receptor C4*) powoduje ciągłą stymulację produkcji prozapalnych cytokin z rodziny IL-1: IL-1 i IL-18, prowadząc do śmierci makrofagów w mechanizmie zapalenia [26]. Opisano przypadek uogólnionej reakcji zapalnej z hiperferytynemią, hipertrójglicerydemią, hipofibrynogemiami, pancytopenią, obniżeniem liczby komórek NK, splenomegalią i naciekiem makrofagów w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu zapalenia jelit u dziecka z mutacją *NLR4* (*Syndrome of enterocolitis and autoinflammation*

Tabela II – Rodzinne HLH (FHL). Opracowanie wg [4, 6, 22–25]
Table II – Family HLH. According to [4, 6, 22–25]

Choroba	Gen (białko)	Charakterystyczne cechy kliniczne	Wynik badania cytometrycznego
FHL2	PRF1 (Perforyna)	Typowo wczesny początek, mutacja hipomorfczna A91V (częściowa utrata funkcji)	Ekspresja perforyny obniżona lub brak, prawidłowy test degranulacji
FHL3	UNC13D (MUNC 13-4)	Typowo wczesny początek. Często zajęcie OUN	Upośledzenie degranulacji komórek NK
FHL4	STX11 (Syntaxin 11)	Prawie wyłącznie u pacjentów tureckiego/arabskiego pochodzenia	Upośledzenie degranulacji komórek NK
FHL5	STXBP2 (MUNC 18-2)	Hipogammaglobulinemia. Enteropatia. Zaburzenia funkcji płytek krwi	Upośledzenie degranulacji komórek NK

associated with mutation in *NLR4*; *SCAN4*) [26] oraz związek mutacji z nawracającym zespołem aktywacji makrofagów (MAS) [15].

Lizynuryczna nietolerancja białek (*lysineric protein intolerance*; LPI) jest wrodzonym zaburzeniem transportu aminokwasów kationowych (lizyny, argininy i ornityny) w komórkach jelita i nerek spowodowanym mutacją genu *SLC7A7* [16]. Choć LPI była postrzegana jako łagodne zaburzenie cyklu mocznikowego korygowane dietą niskobiałkową, pojawiają się doniesienia o ciężkim przebiegu choroby [27]. Zaburzenia odpowiedzi immunologicznej przypisywane są nadprodukcji tlenu azotu (NO) wtórnej do wewnątrzkomórkowego wychwytu argininy, co może przyczynić się do rozwoju powikłań systemowych, w tym HLH [27].

Hemoooksygenaza 1 (HO-1) jest enzymem degradującym hem i hamującym reakcję zapalną poprzez produkcję tlenu azotu (CO) [17]. Kompleks HO-1/CO moduluje funkcje komórek prezentujących antygen i limfocytów T [17]. Niedobór HO-1 spowodowany mutacją genu *Hmox1* prowadzi do gromadzenia hemu i związanych z nim powikłań metabolicznych i naczyniowych oraz ostrej reakcji zapalnej [28].

Mutacje upośledzające zdolności cytotoksyczne limfocytów zwiększają podatność na rozwój chorób autoimmunologicznych i nowotworowych [29, 30], jak również częstość niepowodzeń położniczych [30].

Patofizjologia

Jak dotychczas, większość badań poświęconych była wyjaśnianiu patofizjologii wrodzonych postaci choroby. Mutację genu perforyny jako przyczynę FHL opisano po raz pierwszy

Tabela III – Główne czynniki biorące udział w efekcie cytotoksycznym limfocytów [32]
Table III – The main factors involved in the result of cytotoxic lymphocytes [32]

Czynnik	Mechanizm działania
perforyna	tworzenie porów w błonie komórkowej, indukcja pośrednio apoptozy
granzymy	proteoliza białek cytoplazmy i białek jądrowych, indukcja apoptozy
enzymy lizosomowe	proteoliza białek cytoplazmy i białek jądrowych, indukcja apoptozy
p-40-TIA-1	stymulacja degradacji DNA
granulizyna	uszkodzenie błon komórkowych, indukcja apoptozy

w 1999 roku [18]. W następnych latach odkryto kolejne geny odpowiedzialne za rozwój genetycznych postaci choroby [19–21]. Wspólną ich cechą jest zaburzenie w produkcji białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mechanizmu cytotoksyczności zależnej od ziarnistości [31]. W procesie tym ziarnistości cytotoksyczne zawierające perforynę i granzymy uwalniane są do synapsy immunologicznej wytworzonej między komórkami cytolitycznymi (limfocytami T cytotoksycznymi lub komórkami NK) a komórkami docelowymi (komórki zakażone lub nowotworowe) [31].

Perforyna jest glikoproteiną mającą zdolność do wbudowywania się i tworzenia kanałów w błonie cytoplazmatycznej komórek docelowych. Końcowym wynikiem działania perforyny jest indukcja apoptozy w komórce docelowej i w konsekwencji degradacja DNA.

Reakcja cytotoksyczna zależna od ziaren przebiega kilkietapowo. Po połączeniu z komórką docelową dochodzi do polaryzacji limfocytu cytotoksycznego i takiej zmiany jego kształtu, aby zwiększyć kontakt z komórką docelową. Ostateczny efekt cytotoksyczny zależny jest od wydzielenia przez komórkę cytolityczną, do przestrzeni międzykomórkowej, zawartości ziarnistości cytotoksycznych, które zdolne są do bezpośredniego uszkodzenia i zabicia komórki docelowej. Zjawisko to określane jest w piśmiennictwie jako *lethal hit* („śmiertelny cios”) [32].

Główne czynniki biorące bezpośredni udział w efekcie cytotoksycznym limfocytów przedstawiono w tabeli III.

Badania na modelu mysim wykazały główną rolę komórek T CD8+ i nadprodukcji INF_{γ} w patogenezie HLH [33]. Zaburzona zdolność limfocytów cytotoksycznych do usuwania komórek prezentujących antygen prowadzi do ciągłej stymulacji limfocytów CD8+ i uwalniania cytokin prozapalnych – INF_{γ} , TNF_{α} , IL-6, IL-10, M-CSF [31]. Objawy kliniczne obserwowane w HLH są wynikiem hipercytokinemii [34] i poliklonalnej proliferacji limfocytów cytotoksycznych i komórek prezentujących antygeny (histiocyty-makrofagi) [4, 29]. Naciekanie tkanek i narządów przez te komórki oraz wzrost stężenia TNF_{α} , IL-1, IL-6, IL-8, INF_{γ} powodują uszkodzenie narządów i mogą prowadzić do śmierci pacjenta.

Objawy kliniczne

Niezależnie od etiologii, limfohistiocytoza hemofagocytarna charakteryzuje się szerokim spektrum objawów klinicznych, od przedłużającej się gorączki do zespołu niewydolności wielonarządowej. Gorączka może nie występować u noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie [4]. Głównymi

objawami klinicznymi HLH są trwająca ponad 7 dni gorączka, splenomegalia oraz pancytopenia we krwi obwodowej [35–37]. Niespecyficzność tych objawów może być przyczyną opóźnionego rozpoznania HLH. Zaburzenia stwierdzone w dodatkowych badaniach laboratoryjnych obejmują hiperferrytynię (nierzadko $>10\,000\ \mu\text{g/L}$), hipertrójglicerydemię, hipofibrynogenię, hipertransaminazemię, hiperbilirubinemię, hipoalbuminemię, hiponatremię, koagulopatię czy pleocytozę w płynie mózgowo-rdzeniowym [35, 38]. W badaniu cytologicznym lub histopatologicznym zajętego narządu może być obecna hemofagocytoza [39], jednak warto podkreślić, że nie jest to kryterium konieczne do rozpoznania HLH. Aktualne kryteria diagnostyczne HLH zostały opracowane przez Histiocyte Society w 2004 roku [35]. Przedstawiono je w tabeli IV.

Do rozpoznania FHL wystarczające jest stwierdzenie występowania typowych mutacji genetycznych, niezależnie od liczby spełnionych kryteriów wg HLH-2004 [35]. Nawrót HLH, przy braku współistniejącej choroby autoimmunologicznej lub nowotworowej, może sugerować rodzinną postać choroby [40].

U pacjentów dorosłych, w przeciwieństwie do dzieci, znacznie zwiększone stężenie ferrytyny nie jest specyficzne dla HLH [41]. Badacze sugerują, by wartość graniczna stężenia ferrytyny niezbędna do rozpoznania HLH u dzieci została podwyższona [4]. Liczba płytek krwi wykazuje odwrotną korelację z aktywnością choroby [4]. Oba wyżej wymienione parametry odgrywają rolę czynnika prognostycznego w HLH u dzieci [42].

Nacieczenie ośrodkowego układu nerwowego przez proliferujące fagocyty w przebiegu HLH stwierdzone jest u około jednej trzeciej pacjentów z rodzinną postacią choroby [4]. U połowy dzieci obserwuje się umiarkowaną pleocytozę i/lub podwyższony poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym [43]. Objawy zajęcia OUN obejmują różnego stopnia zaburzenia neurologiczne oraz zmiany w MRI mózgu [44–46]. Trudności diagnostycznych dostarczają pacjenci z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego bez układowych objawów HLH lub w przypadkach, gdy objawy układowe ujawniają się w późniejszym przebiegu choroby. U pacjentów z dwuallelową mutacją w genie PRF1 i UNC13D opisywano zaburzenia

neurologiczne jako pierwszy i/lub najbardziej znaczący objaw kliniczny [47, 48].

Wątroba jest jednym z narządów najczęściej objętych procesem zapalnym w HLH [49]. Przewlekłe zapalenie wątroby z okołowrotnym naciekiem limfocytów, choroba wenookluzyjna naczyń żylnych wątroby oraz koagulopatia są związane z nacieczeniem tego narządu [49–52]. HLH powinno być uwzględnione w rozpoznaniu różnicowym każdego pacjenta z idiopatyczną niewydolnością wątroby [53].

W niektórych genetycznych postaciach HLH mogą być obecne swoiste objawy kliniczne. Zapalenie jelit (colitis) stwierdza się u 38% pacjentów z mutacją STXBP [54] i 17% pacjentów z mutacją XIAP [55]. Hipogammaglobulinemia jest opisywana u 2/3 pacjentów z mutacjami SAP [56] i STXBP2 [54]. Mutacje UNC13D i STXBP2 powodują zaburzenia funkcji płytek krwi [25, 54].

Zespół hemofagocytarny wywołany infekcją może rozwinąć się także mimo ciężkiego niedoboru komórek T i NK i być pierwszą kliniczną manifestacją pierwotnego niedoboru odporności [57].

Wtórne HLH

Mechanizm wtórnego HLH nie jest do końca poznany. W odróżnieniu od FHL, u większości pacjentów z sHLH nie stwierdza się zaburzeń cytotoksyczności. U niewielkiego odsetka chorych z sHLH wykryto jednak monoalleliczną mutację w jednym lub więcej genów związanych z FHL [58]. Choć obserwacja ta sugeruje poligenowy model dziedziczenia HLH, dotychczas tylko w badaniu na modelu mysim wykazano, że akumulacja monoallelicznych mutacji zwiększa ryzyko rozwoju HLH [58]. Badania na modelu zwierzęcym wskazują na wzmocnioną prezentację antygenów lub nadmierną sygnalizację z receptorów Toll-like (Toll-like receptors; TLR) jako mechanizmy odpowiedzialne za rozwój wtórnej postaci HLH [59].

Wtórne (nabyte) HLH (secondary HLH; sHLH) rozwija się w następstwie intensywnej aktywacji układu immunologicznego spowodowanej zakażeniem (infection-associated HLH; I-HLH), chorobą autoimmunologiczną lub nowotworem (malignancy-associated HLH; M-HLH) [60–62]. HLH może również wystąpić w przebiegu chorób metabolicznych, w trakcie leczenia immunosupresyjnego oraz po transplantacjach narządów [63].

Wirusem, który najczęściej powoduje aktywację HLH, jest wirus Epsteina i Barr (EBV) [52, 64–66]. Innymi czynnikami infekcyjnymi mogącymi zapoczątkować HLH są CMV, HCV, HHV-6, HHV-8, HIV, wirus grypy, wirus różyczki, wirus ospy wietrznej, parwowirus, adenowirus, gruźlica, brucelloza, kiła, mykoplasma, pasożyty (gł. leiszmanioza) oraz grzyby. Istnieje odwrotna korelacja między stopniem upośledzenia zdolności cytotoksycznych organizmu a aktywnością czynnika infekcyjnego potrzebną do wyindukowania HLH [5].

HLH w przebiegu choroby nowotworowej dotyczy zwłaszcza pacjentów z rozrostem T- i NK-komórkowym, rozlanym chłoniakiem z dużych komórek B oraz chłoniakiem Hodgkina [67]. U dzieci nowotwory T-komórkowe są dominującym czynnikiem wywołującym HLH. Objawy

Tabela IV – Kryteria diagnostyczne HLH wg Histiocyte Society [35]
Table IV – Diagnostic criteria for HLH by Histiocyte Society [35]

Kryteria diagnostyczne HLH wg Histiocyte Society

- I. Obecność mutacji typowej dla HLH
- II. Lub spełnienie 5 z 8 kryteriów:
 1. Gorączka
 2. Splenomegalia
 3. Cytopenia dotycząca 2 lub 3 linii komórkowych
 4. Hipertrójglicydemia $> 3\ \text{mmol/l}$ ($\geq 265\ \text{mg/dl}$) i/lub hipofibrynogeniemia $< 1,5\ \text{g/l}$
 5. Hemofagocytoza w szpiku kostnym, śledzionie, węzle chłonny lub PMR
 6. Niska aktywność komórek NK lub jej brak
 7. Hiperferrytynemia $\geq 500\ \mu\text{g/l}$
 8. Stężenie rozpuszczonego receptora IL-2 (sCD25) $\geq 2400\ \text{U/ml}$

zespołu hemofagocytarnego mogą być pierwszymi oznakami choroby nowotworowej lub wystąpić w dowolnym momencie leczenia, najczęściej w kontekście czynnika infekcyjnego. Podłoże infekcyjne stwierdzane jest w 75–100% przypadków M-HLH [67].

HLH u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi i układowymi chorobami zapalnymi jest określane w literaturze jako zespół aktywacji makrofagów (*macrophage activation syndrome*; MAS) [68]. Do rozwoju MAS dochodzi najczęściej w przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (MIZS) o układowym początku [69] oraz jego odpowiedniku u dorosłych – chorobie Stilla, a także w przebiegu tocznia układowego czy wieloogniskowej choroby Castlemana [64]. Choć występowanie MAS u pacjentów z MIZS jest szacowane na około 10%, najnowsze badania sugerują możliwe subkliniczne objawy aż u 30–40% chorych [70]. Patofizjologia choroby nie jest do końca wyjaśniona [71]. Badanie kliniczne na modelu mysim sugeruje wpływ powtarzającej się stymulacji receptora TLR9 (*toll-like receptor 9*) na rozwój MAS [72], podkreśla się także znaczenie podłoża genetycznego choroby [73–75]. W odróżnieniu od pozostałych postaci HLH, INF γ nie odgrywa istotnej roli w immunopatologii choroby [29]. Objawy choroby podstawowej, takie jak ból i obrzęk stawów, mogą pokrywać się z objawami HLH, gdzie w wyniku nadmiernej proliferacji makrofagów i fagocytów dochodzi do nacieków i bólów kostno-mięśniowych [52, 76]. Z uwagi na niespecyficzność objawów klinicznych, kryteria rozpoznania MAS opierają się na występowaniu gorączki oraz odchyleniach w badaniach laboratoryjnych [77]. U większości pacjentów z MIZS obserwuje się podwyższoną liczbę płytek krwi oraz podwyższony poziom fibrynogenu w związku z układową reakcją zapalną, zatem wyniki badań mieszczące się w granicach normy laboratoryjnej mogą budzić podejrzenie MAS [78]. Podobnie nawet nieznacznie podwyższona aktywność transaminaz i poziom trójglicerydów, jako odchylenia niecharakterystyczne dla choroby o podłożu autoimmunologicznym, w połączeniu z danymi klinicznymi mogą nasunąć takie podejrzenie [78]. Kryteria rozpoznania MAS przedstawiono w tabeli V.

Testy czynnościowe w diagnostyce HLH

W przebiegu różnych form HLH występują nieprawidłowości funkcjonalne i liczbowe komórek NK [10]. Odkrycie zaburzenia funkcji komórek NK jako markera FHL było krokiem milowym w diagnostyce choroby [79].

Tabela V – Kryteria rozpoznania zespołu aktywacji makrofagów [77]

Table V – Criteria for diagnosis of macrophage activation [77]

Gorączka oraz podejrzenie/rozpoznanie MIZS i:
Ferrytyna >684 ng/ml (>684 ug/l) oraz min. 2 z następujących:
Liczba płytek krwi \leq 181 tys/ul
Aminotransferaza asparaginowa (AST) >48U/l
Trójglicerydy >156 mg/dl
Fibrynogen \leq 360 mg/dl (\leq 3,6 g/l)

Aktywność cytotoksyczna limfocytów NK badana jest za pomocą testu cytotoksycznego określającego cytotoksyczność jako liczbę komórek linii białaczkowej K562 zabitych przez komórki cytotoksyczne. Badanie wykonywane jest w cytometrze przepływowym z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego i jodku propidyny jako znacznika [10].

Obniżenie wartości wyników testu cytotoksycznego, przedstawianych jako % cytotoksyczności może być skutkiem obniżenia liczby krążących komórek NK lub upośledzenia ich funkcji cytotoksycznych. Wynik testu cytotoksycznego nie pozwala na odróżnienie pacjentów z pierwotną i wtórną postacią HLH [18].

Obniżona liczba komórek NK w nabytym HLH może być spowodowana nadmiernym zużyciem komórek podczas intensywnej aktywacji układu immunologicznego i powinna powrócić do normy w okresie remisji. W przypadku defektów uwarunkowanych genetycznie zaburzenie jest trwałe. Stwierdzenie trwałego obniżenia zdolności cytotoksycznych przy prawidłowej liczbie komórek NK sugeruje istnienie rodzinnej formy HLH.

Test degranulacji wykorzystuje ocenę ekspresji antygenów CD 107a (*Lysosome Associated Membrane Protein-1*; LAMP-1) i CD 107b (LAMP-2) wchodzących w skład błony lizosomalnej. W wyniku stymulacji komórki NK dochodzi do degranulacji i przemieszczenia cząsteczek CD 107 na błonę komórkową. Identyfikacja egzocytozy CD 107a i CD107b na powierzchni komórki wskazuje na aktywację cytotoksyczną [22].

Upośledzona ekspresja antygeny CD 107a i/lub b na powierzchni poddanej aktywacji komórki cytotoksycznej wskazuje na upośledzenie procesu degranulacji prowadzące do zaburzenia reakcji cytotoksycznej i stanowi wskazanie do rozszerzenia diagnostyki w kierunku rodzinnej postaci HLH [80, 81].

Dodatkowymi badaniami czynności komórek NK jest ocena ilości perforyny i granzymów w komórkach, ilościowa ocena poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za ich syntezę oraz identyfikacja mutacji genetycznych odpowiedzialnych za występowanie ewentualnych zaburzeń ilościowych. Badanie cytometrii przepływowej pozwala pośrednio identyfikować defekty genetyczne [22].

Mutacja w genie kodującym perforynę (PRF1) odpowiedzialna jest za typ 2 FHL. Ocena ekspresji wewnątrzkomórkowej perforyny oceniana za pomocą cytometrii przepływowej jest szybkim i niezawodnym narzędziem identyfikującym pacjentów z podejrzeniem FHL-2 [82, 83].

Geny UNC13D i STX11 są odpowiedzialne za produkcję białek biorących udział w dojrzewaniu i fuzji ziarnistości egzocytarnej z błoną komórkową. Ich mutacje powodują zaburzenie procesu degranulacji i sekrecji enzymów, co blokuje funkcję cytotoksyczną komórek. W efekcie tego u pacjentów uzyskuje się obniżone wyniki zarówno testu cytotoksycznego, jak i testu degranulacji.

Wzrost stężenia rozpuszczalnego receptora IL-2 (sCD25) jest miarą aktywacji limfocytów T, przez co odzwierciedla kontrolę aktywności choroby [40]. Test oceniający wzrost stężenia sCD25 jest wykonywany tylko w niewielu wyspecjalizowanych laboratoriach.

Hemofagocytoza, odbywająca się dzięki receptorowi wiążącemu hem CD163 na zaktywowanych makrofagach, jest

oznaką aktywności makrofagów. Jest charakterystycznym objawem morfologicznym HLH, lecz nie zawsze obecnym, zwłaszcza w początkowych stadiach choroby [39]. Hemofagocytoza nie jest też cechą swoistą HLH – może występować również w przebiegu infekcji, chorób nowotworowych niezwiązanych z HLH, a także niedokrwistości hemolitycznych czy chorób metabolicznych [52].

Leczenie i rokowanie

Przebieg choroby w postaciach pierwotnych i wtórnych jest podobny, a rokowanie bardzo poważne. Brak właściwego leczenia prowadzi nieuchronnie do śmierci pacjenta w przypadkach wrodzonego HLH i w większości zespołów nabytych.

Terapia każdej formy HLH u dzieci i dorosłych opiera się na wygaszaniu pobudzonego układu immunologicznego poprzez zniszczenie aktywowanych limfocytów T CD8+ i makrofagów oraz usunięciu czynnika wywołującego chorobę. Wszyscy pacjenci z pierwotnym HLH wymagają przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych (stem cell transplantation; SCT) do całkowitego wyleczenia choroby [63, 84].

Przed wprowadzeniem nowoczesnych metod leczenia roczne przeżycie w postaciach wrodzonych było bliskie 0% [85]. Po wprowadzeniu protokołu HLH-94 przeżycie 5-letnie wzrosło do 54% dla postaci nabytych i 62% dla postaci wrodzonych po przeszczepieniu szpiku od dawcy rodzinnego [86].

Pierwsze udane SCT, jako metodę leczenia HLH, wykonano w połowie lat 80. ubiegłego wieku [87]. W kolejnych latach ukazywało się wiele prac potwierdzających skuteczność tej procedury w leczeniu HLH u dzieci. Na początku obecnego stulecia 3-5-letnie przeżycie pacjentów z HLH poddanych allo-SCT wynosiło około 60% [51, 84, 88]. Wprowadzenie kondycjonowania o mniejszej toksyczności, złożonego z alemtuzumabu, fludarabiny i melfalanu, poprawiło 3-letnią przeżywalność pacjentów do 92% [89]. Obserwowano mniejszą ilość powikłań, w tym wenookluzyjnej choroby naczyń żylnych wątroby, i zgonów w pierwszych 100 dniach po przeszczepieniu, jednakże u znacznej większości pacjentów stwierdzano mieszany chimeryzm dawcy i biorcy [90]. Dowiedziono, że chimeryzm dawcy powyżej 20-30% jest wystarczający do zabezpieczenia przed nawrotem FHLH u większości pacjentów po okresie immunosupresji [91].

Duże nadzieje wiązane są z rozwojem terapii genowej jako metody leczenia HLH [38, 92, 93]. W badaniu na modelu mysim, po przeniesieniu ludzkiego genu perforyny do komórek myszy z mutacją genu perforyny *prf-/-* przy użyciu lentiwirusowego wektora, obserwowano ekspresję perforyny w dojrzałych komórkach T i NK. Stwierdzono całkowity powrót zdolności cytotoksycznych w poliklonalnych komórkach T i częściowy w komórkach NK. Zrekonstruowane limfoblasty CD8+ wykazywały niższą sekrecję INF γ , co wskazuje na prawidłową odnowę układu immunologicznego. Ponadto obserwowano zmniejszenie nadprodukcji cytokin oraz znacząco mniejszą cytopenię we krwi obwodowej u osobników z chimeryzmem $\geq 30\%$. Wyniki te pokazują potencjalne możliwości terapii genowej dla FHL-2 [94].

Podsumowanie

Limfohistiocytoza hemofagocytarna jest heterogennym zespołem chorobowym. Z powodu ostrego i nieraz ciężkiego przebiegu HLH znajomość objawów i kryteriów diagnostycznych tego zespołu chorobowego wśród lekarzy różnych specjalności jest konieczna dla jak najszybszego ustalenia rozpoznania HLH oraz włączenia właściwego leczenia.

Nowoczesne metody diagnostyki i terapii dają nadzieję na poprawę wyników leczenia pacjentów.

Wkład autorów/Authors' contributions

IM – koncepcja pracy, zebranie i interpretacja danych, akceptacja ostatecznej wersji, przygotowanie piśmiennictwa, pozyskanie funduszy. MW – koncepcja pracy, zebranie i interpretacja danych, akceptacja ostatecznej wersji, przygotowanie piśmiennictwa.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Pracę zrealizowano w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (Polska) nr NN4070908 pt. „Standaryzacja badań laboratoryjnych w zespole hemofagocytarnym u dzieci”

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Vaiselbuh SR, Bryceson YT, Allen CE, et al. Updates on histiocytic disorders. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61:1329-1335.
- [2] Emile JF, Ablan O, Fraitag S, et al. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood* 2016;127:2672-2681.
- [3] Farquhar JW, Claireaux AE. Familial haemophagocytic reticulosis. *Arch Dis Child* 1952;27:519-525.
- [4] Janka G, Lehmsberg K. Hemophagocytic syndrome – an update. *Blood reviews* 2014;28:135-142.
- [5] Schmid JP, Cote M, Menager MM, et al. Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. *Immunol Rev* 2010;235:10-23.
- [6] Zhang K, Jordan MB, Marsh RA, et al. Hypomorphic mutations in PRF1, MUNC13-4, and STXBP2 are associated with adult-onset familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011;118:5794-5798.
- [7] Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, et al. Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 2007;92:978-981.

- [8] Sieni E, Cetica V, Piccin A, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis may present during adulthood: clinical and genetic features of a small series. *PLoS One* 2012;7:e44649H.
- [9] Henter JI, Elinder G, Soder O, Ost A. Incidence in Sweden and clinical features of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr Scand* 1991;80(4):428-435.
- [10] Popko K, Jasinska J, Górska E, et al. Impairment of immune function in children with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Adv Exp Med. Biol.* DOI 10.1007/5584_2016_210
- [11] Booth C, Gilmour KC, Veys P, et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on manifestations, management and outcome of the disease. *Blood* 2011;117:53-62.
- [12] Meeths M, Bryceson YT, Rudd E, et al. Clinical presentation of Griscelli syndrome type 2 and spectrum of RAB27A mutations. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:563-572.
- [13] Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet* 1996;14:307-311.
- [14] Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006;444:110-114.
- [15] Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, et al. An activating NLR4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet* 2014;46(10):1140-1146.
- [16] Torrents D, Mykkanen J, Pineda M. Identification of SLC7A7, encoding y(+)-LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 1999;21:293-296.
- [17] Riquelme SA, Carreno LJ, Espinoza JA, et al. Modulation of antigen processing by haem-oxygenase 1. Implications on inflammation and tolerance. *Immunology*. doi:10.1111/imm.12605
- [18] Stepp SE, Dufoureq-Lagelouse R, Le Deist F, et al. Perforin gene defect in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999;286:1957-1959.
- [19] Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al. Munc 13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003;115:461-473.
- [20] zur Stadt U, Schmid S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 4 (FHL-4) to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet* 2005;14:827-834.
- [21] zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc 18-2 and impaired binding to syntaxin11. *Am J Hum Genet* 2009;85:482-492.
- [22] Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 2012;119:2754-2763.
- [23] Sieni E, Cetica C, Santoro A, et al. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *J Med Genet* 2011;48:343-352.
- [24] zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat* 2006;27:62-68.
- [25] Sandrock K, Nakamura L, Vraetz T, Beutel K, Ehl S, Zieger B. Platelet secretion defect in patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5). *Blood* 2010;116:6148-6150.
- [26] Romberg N, Moussawi KA, Nelson-Williams C, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat Genet* 2014;46(10):1135-1139.
- [27] Ogier de Baulny H, Schiff M, Dionisi-Vici C. Lysinuric protein intolerance (LPI): a multi organ disease by far more complex than a classic urea cycle disorder. *Mol Genet Metab* 2012 May;106(1):12-17.
- [28] Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-135.
- [29] Meeths M, Chiang SCC, Lofstedt A, et al. Pathophysiology and spectrum of diseases caused by defects in lymphocyte cytotoxicity. *Exp Cell Research* 2014;325:10-17.
- [30] Cichocki F, Sitnicka E, Bryceson YT. NK cell development and function – plasticity and redundancy unleashed. *Seminars in Immunology* 2014;26:114-126.
- [31] Sieni E, Cetica V, Mastrodicasa E, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: a model of understanding the human machinery of cellular cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:29-40.
- [32] Malejczyk J. Mechanizmy cytotoksyczności limfocytów. W: Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, reds. *Immunologia*. Warszawa: PWN; 2004. p. 277-287.
- [33] Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, et al. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004;104:735-743.
- [34] Creput C, Galicier L, Buyse S, Azoulay E. Understanding organ dysfunction in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Intensive Care Med* 2008;34:1177-1187.
- [35] Henter JI, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-131.
- [36] Mehta RS, Smith RE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): A review of literature. *Med Oncol* 2013;30:740.
- [37] Sifers TM, Raju N, Dinakar C. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: a concise review for the practicing physician 2016;37(3):256-258.
- [38] Chandrakasan S, Filipowich A. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *J Pediatr*; dx.doi.org/10.1016/j.peds.2013.06.053
- [39] Machaczka M, Klimkowska M. Bone marrow assessment in the diagnosis of acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Am J Clin Pathol* 2015;143:308-309.
- [40] Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipowich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011;118:4041-4052.
- [41] Schram AM, Campigotto F, Mullally A, et al. Marked hyperferritinemia does not predict for HLH in the adult population. *Blood* 2015;125(10):1548-1552.
- [42] Trottestam H, Berglof E, Horne A, et al. Risk factors for early death in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr* 2011;101:313-318.
- [43] Horne A, Trottestam H, Arico M, et al. Frequency and spectrum of central nervous system involvement in 193 children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2008;140:327-335.
- [44] Chiapparini L, Uziel G, Vallinoto C, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis with neurological presentation: MRI findings and a nearly miss diagnosis. *Neurol Sci* 2011;32:473.
- [45] Deiva K, Mahlaoui N, Beaudonnet F, et al. CNS involvement at the onset of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Neurology* 2012;78:1150-1156.
- [46] Rego I, Severino M, Micalizzi C, et al. Neuroradiologic findings and follow-up with magnetic resonance imaging of the genetic forms of haemophagocytic lymphohistiocytosis with CNS involvement. *Pediatr Blood Cancer* 2011;58:810-814.

- [47] Feldmann J, Menasche G, Callebaut I, et al. Severe and progressive encephalitis as a presenting manifestation of a novel missense perforin mutation and impaired cytolytic activity. *Blood* 2005;105:2658-2663.
- [48] Weisfeld-Adams JD, Frank Y, Havalad V, et al. Diagnostic challenges in a child with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHLH3) presenting with fulminant neurological disease. *Childs Nerv Syst* 2009;25:153-159.
- [49] de Kerguenec C, Hillaire S, Molinie V, et al. Hepatic manifestations of hemophagocytic syndrome: a study of 30 cases. *Am J Gastroenterol* 2001;96:852-857.
- [50] Ost A, Nilsson-Ardnor S, Henter JI. Autopsy findings in 27 children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Histopathology* 1998;32(4):310-316.
- [51] Ouachee-Chardin M, Elie C, de Saint Basile G, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics* 2006;117(4):e743-e750.
- [52] Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr* 2007;166:95-109.
- [53] Weitzman S. Approach to hemophagocytic lymphohistiocytosis. *American Society of Hematology Education Program Book* 2011;178-183.
- [54] Pagel J, Beutel K, Lehmborg K, et al. Distinct mutations in STXBP2 are associated with variable clinical presentations in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL5). *Blood* 2012;119:6016-6024.
- [55] Speckmann C, Lehmborg K, Albert MH, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) deficiency: the spectrum of presenting manifestations beyond hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Immunol* 2013;149:133-141.
- [56] Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* 2011;117:1522-1529.
- [57] Bode SF, Ammann S, Al-Herz W. The syndrome of hemophagocytic lymphohistiocytosis in primary immunodeficiencies: implications for differential diagnosis and pathogenesis. *Haematologica* 2015;100(7):978-988.
- [58] Sepulveda F, Garrigue A, Maschalidi S, et al. Polygenic mutations in the cytotoxicity pathway increase susceptibility to develop HLH immunopathology in mice. *Blood* 2016;127(17):2113-2121.
- [59] Canna SW, Behrens EM. Not all hemophagocytes are created equally: appreciating the heterogeneity of the hemophagocytic syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:113-118.
- [60] Janka G. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: when the immune system runs amok. *Klin Pediatr* 2009;221:278-285.
- [61] Gupta S, Weitzman S. Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical features, pathogenesis and therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6:137-154.
- [62] Machaczka M, Vaktinas J, Klimkowska M, et al. Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: a retrospective population-based analysis from a single center. *Leuk Lymphoma* 2011;52:613-619.
- [63] Jordan MB, Filipowich AH. Hematopoietic cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis: a journey of a thousand miles begins with a single (big) step. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:433-437.
- [64] Larroche C, Mouthon L. Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). *Autoim rev* 2004;3:69-75.
- [65] Beutel K, Gross-Wieltsch U, Wiesel T, et al. Infection of T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children of non-Asia origin. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:184-190.
- [66] Imashuku S. Treatment of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH); update 2010. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33(1):35-39.
- [67] Lehmborg K, Nichols KE, Henter JI, et al. Consensus recommendations for the diagnosis and management of hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with malignancies. *Haematologica* 2015;100(8):997-1004.
- [68] Atteritano M, David A, Bagnato G, et al. Haemophagocytic syndrome in rheumatic patients. A systemic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16:1414-1424.
- [69] Ravelli A, Grom AA, Behrens EM, Cron RQ. Macrophage activation syndrome as part of systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, genetics, pathophysiology and treatment. *Genes Immun* 2012;13:289-298.
- [70] Behrens EM, Beukelman T, Paessler M, et al. Occult macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007;56:1133-1138.
- [71] Weaver LK, Behrens EM. Hyperinflammation, rather than hemophagocytosis, is the common link between macrophage activation syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:562-569.
- [72] Behrens EM, Canna SW, Slade K, et al. Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2264-2277.
- [73] Zhang M, Behrens EM, Atkinson TP, et al. Genetic defects in cytotoxicity in macrophage activation syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:439.
- [74] Kaufman KM, Linghu B, Szustakowski JD, et al. Whole-exome sequencing reveals overlap between macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis and familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:3486-3495.
- [75] Hazen MM, Woodward AL, Hofmann I, et al. Mutations of the hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated gene UNC13D in a patient with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthr Rheum* 2008;58(2):567-570.
- [76] Kelly A, Ramanan AV. Recognition and management of macrophage activation syndrome in juvenile arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:477-481.
- [77] Ravelli A, Minoia F, Davi S, et al. 2016 Classification criteria for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:481-489.
- [78] Davi S, Minoia F, Pistorio A, et al., on behalf of the Paediatric Rheumatology International Trials Organisation, the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance, the Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group, and the Histiocyte Society. Performance of current guidelines for diagnosis of macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2871-2880.
- [79] Perez N, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Fischer A, Griscelli C. Impaired natural killer activity in lymphohistiocytosis syndrome. *J Pediatr* 1984;104(4):569-573.
- [80] Marcenaro S, Gallo F, Martini S, et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood* 2006;108(7):2316-2323.
- [81] Wheeler RD, Cale CM, Cetica V, Arico M, Gilmour KC. A novel assay for investigation of suspected familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2010;150:727-730.
- [82] Kogawa K, Lee SM, Villanueva J, et al. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood* 2002;99(1):61-66.

- [83] Abdalgani M, Filipowich AH, Choo S, et al. Accuracy of flow cytometric perforin screening for detecting patients with FHL due to PRF1 mutations. *Blood* 2015;126:1858-1860.
- [84] Horne A, Janka G, Egeler MR, et al. Haematopoietic stem cell transplantation in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2005;129:622-630.
- [85] Arico M, Janka G, Fischer A. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL study group of the Histiocyte Society. *Leuk* 1996;10(2):197-203.
- [86] Trottestam H, Horne A, Arico M, et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood* 2011;118:4577-4584.
- [87] Fischer A, Cerf-Bensussan N, Blanche S, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr* 1986;108:267-270.
- [88] Baker KS, Filipowich AH, Gross TG, et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Bone Marrow Transplantation* 2008;42:175-180.
- [89] Marsh RA, Jordan MB, Filipowich AH. Reduced-intensity conditioning haematopoietic cell transplantation for haemophagocytic lymphohistiocytosis: an important step forward. *Br J Haematol* 2011;154:556-563.
- [90] Marsh RA, Kim MO, Liu C, et al. An intermediate alemtuzumab schedule reduces the incidence of mixed chimerism following reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1625-1631.
- [91] Hartz B, Marsh R, Rao K, et al. The minimum required level of donor chimerism in hereditary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2016;127:3281-3290.
- [92] Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders. *Blood* 2008;111:4431-4444.
- [93] Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders. *Blood* 2013;122:1556-1564.
- [94] Carmo M, Risma KA, Arumugam P, et al. Perforin gene transfer into hematopoietic stem cells improves immune dysregulation in murine models of perforin deficiency. *Mol Ther* 2015;23(4):737-745.