

Vesna Vidmar¹, Marina Zabukovec²

Klinične, imunološke in genetske značilnosti bolnikov z avtoimunskim limfoproliferativnim sindromom v Sloveniji³

Clinical, Immunological and Genetic Characteristics of Patients with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: avtoimunske bolezni, limfoproliferativne motnje – imunologija – genetika

IZHODIŠČA. Avtoimunski limfoproliferativni sindrom je primarna imunska pomanjkljivost, za katero je značilna motnja v nadzoru imunskega odziva. Definiran je kot kronična nemaligna limfoproliferacija pri bolnikih s povišano vrednostjo dvojno negativnih celic T > 1 % in moteno apoptozo limfocitov *in vitro*. Etiologija bolezni ni popolnoma pojasnjena, spekter kliničnih manifestacij je zelo širok, natančni diagnostični kriteriji pa še niso postavljeni. **NAMEN.** Namen naše raziskave je bil razjasniti klinično, imunološko in genetsko ozadje bolnikov z avtoimunskim limfoproliferativnim sindromom v Sloveniji. **METODE.** V raziskavo smo vključili vse bolnike, ki se vodijo na Pediatrični kliniki v Ljubljani pod sumom na avtoimunski limfoproliferativni sindrom. Vključitveni kriteriji za našo raziskavo so bili: starost pod 18 let, prisotna vsaj ena klinična manifestacija avtoimunskega limfoproliferativnega sindroma ter pozitiven vsaj en laboratorijski imunološki test, značilen za avtoimunski limfoproliferativni sindrom. Retrospektivno smo pregledali vso klinično dokumentacijo o poteku bolezni in pridobili podatke o kliničnih, laboratorijskih in imunoloških značilnostih pri posameznih bolnikih. Podatke o kliničnih manifestacijah smo zbirali ob prvi prezentaciji bolezni in tekom dolgoročnega sledenja bolnika. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo smo s pretočno citometrijo določili vrednosti limfocitnih subpopulacij, z metodo ELISA smo določili serumске vrednosti IL-10 ter opravili test apoptoze limfocitov. V genetskem laboratoriju smo opravili analizo nukleotidnih zaporedij genov za Fas in ligand Fas. **REZULTATI.** V študijo smo vključili 11 bolnikov. Trije bolniki so izpolnjevali dogovorno sprejete kriterije za diagnozo avtoimunski limfoproliferativni sindrom, 8 bolnikov pa je hkrati izpolnjevalo eno klinično in eno laboratorijsko merilo za avtoimunski limfoproliferativni sindrom, vendar niso zadostili predlaganim kriterijem za diagnozo avtoimunski limfoproliferativni sindrom. **ZAKLJUČKI.** Avtoimunski limfoproliferativni sindrom ima zelo raznoliko klinično prezentacijo, ki se pogosto ne izrazi ob prvem pojavu bolezni, ampak tekom let. Značilni imunološki testi so povišana vrednost IL-10, prisotnost več kot 1 % dvojno negativnih celic T in motena apoptozo limfocitov *in vitro*. Nobeden od teh testov ni pozitiven pri vseh bolnikih, zato je potrebno napraviti celotno serijo testov. Genetske analize ne kažejo, da je najpogostejša mutacija gena za Fas pri avtoimunskega limfoproliferativnem sindromu v Sloveniji. Predlagamo protokol preiskav, ki naj se opravijo pri bolnikih s sumom na avtoimunski limfoproliferativni sindrom.

¹ Vesna Vidmar, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

² Marina Zabukovec, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

³ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s fakultetnim Prešernovim priznanjem v letu 2008.

ABSTRACT**KEY WORDS:** autoimmune diseases, lymphoproliferative disorders – immunology – genetics

BACKGROUND. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is a primary immunodeficiency disorder characterized by immune dysregulation. ALPS is defined as chronic, non-malignant lymphoproliferation in patients with double-negative T cell (DNT) expansion over 1% and defective lymphocyte apoptosis. The etiology of the disease has not been fully explained; the spectrum of its clinical manifestations is broad and the exact diagnostic criteria have not yet been established. **AIM.** Our goal was to define the clinical, immunological and genetic background of ALPS patients in our country. **METHODS.** The study included all patients under suspicion of ALPS treated at the University Children's Hospital in Ljubljana. The criteria established by the investigators were: age under 18 years and presence of at least one clinical manifestation and at least one immunological finding characteristic for ALPS. The study was retrospective and involved a review of clinical documentation. Information about clinical, immunological and laboratory findings was collected for every patient, from the time of first presentation of the disease. The patients were followed up to the last clinical examination. At the Institute of Microbiology and Immunology, lymphocyte subtypes were quantified by flow cytometry, serum values of IL-10 were evaluated using the ELISA method, and apoptotic cell death was assessed. At the genetic laboratory, the nucleotide sequences of the Fas gene which encodes Fas protein and Fas ligand gene were analysed. **RESULTS.** The study included 11 patients. Three of them fulfilled all diagnostic criteria for ALPS. The other 8 patients fulfilled the criteria determined by the investigators. This means that they had one clinical and one laboratory finding characteristic for ALPS, but did not fulfil all of the criteria needed for the diagnosis of ALPS. **CONCLUSION.** ALPS is a variable clinical condition with manifestations that can present later in life. The characteristic immunological findings include elevated serum values of IL-10, the presence of DNT cells and defective lymphocyte apoptosis *in vitro*. Not all tests are positive in every patient and for this reason a whole series of tests should be made. In our study, genetic analyses revealed that the most common mutation in Slovenia is not in the gene encoding Fas protein. A protocol of diagnostic procedures was also developed to be used whenever ALPS is suspected.

UVOD

Avtoimunski limfoproliferativni sindrom (ALPS) je primarna imunska pomanjkljivost, za katero je značilna motnja v nadzoru imunskega odziva. Klinične manifestacije ALPS so kronična splenomegalija, limfadenopatija in avtoimunski fenomeni, predvsem imunske posredovane citopenije. Laboratorijsko je za bolezen značilna ekspanzija redkega podtipa limfocitov v periferni krvi in tkivih – celice T, ki izražajo T-celični receptor α/β (TCR $\alpha/\beta+$), ne izražajo pa nobenega izmed koreceptorjev CD4 ali CD8 (CD4-/CD8-), zato te celice imenujemo dvojno negativne celice T (DNT) (1-4).

Pojavlja se pri obeh spolih enako pogosto in ni vezan na nobeno raso. Bolezen se najpogosteje klinično izrazi zgodaj v otroštvu, pov-

prečna starost ob pojavu simptomov je 2 leti. Le redko so bolniki ob nastopu bolezni starejši od 15 let (3). Gre za redko bolezen, ki je bila definirana pred kratkim in v literaturi še ni dostopnih podatkov o pojavnosti. Od leta 1967, ko sta Canale in Smith bolezen prvič opisala, se je število znanih pacientov z ALPS v svetu povzpelo nad 200, točnih podatkov za Slovenijo do izvedbe naše raziskave nismo imeli (5).

KLINIČNE MANIFESTACIJE

Limfadenopatija je značilen klinični znak, skoraj vsi bolniki imajo daljša obdobja tipnih, nebolečih bezgavk. Velikost povečanih bezgavk je različna, značilno pa je, da se ob prehodu v adolescenco znatno zmanjšajo. Primarno so ponavadi povečane vratne ter pazdušne

bezgavke (2, 6). Bolniki ponavadi razvijejo splenomegalijo še preden dopolnijo 5 let. Velikost vranice se lahko s časom spreminja. Nekoč so v terapevtske namene pogosto izvajali splenektomijo, danes to izvajajo le izjemoma (3, 6). Blaga do zmerna hepatomegalija je pri bolnikih z ALPS pogosta, le redko pa se pojavi motnje funkcije jeter (6).

Avtoimunski odziv pri bolnikih z ALPS je večinoma usmerjen proti krvnim celicam. Avtoimunska hemolitična anemija (AIHA) s pozitivnim direktnim Coombsovim testom je najpogostejši avtoimunski zaplet, sledi avtoimunska trombocitopenija (ITP), avtoimunska nevtropenija se pojavlja redkeje. Mnogo redkeje so prisotni drugi avtoimunski fenomeni – glomerulonefritis, Guillain-Barréjev sindrom ter ponavljajoči kožni izpuščaji (koprivnica, nespecifični vaskulitis). Drugi, redko opisani avtoimunski zapleti so artritis, hepatitis, biliarna ciroza, uveitis, ulkusi, pljučni infiltrati in vaskulitis (8).

Pogostnost limfomov pri bolnikih z ALPS je okoli 10 %. Bolniki z ALPS tipa 1a imajo 14-krat večjo možnost, da razvijejo ne-Hodgkinov limfom in 51-krat večjo možnost, da razvijejo Hodgkinovo bolezen (10).

IMUNOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Ključnega pomena za diagnozo ALPS je fenotipizacija limfocitov iz vzorca periferne krvi. V periferni krvi so povišane vrednosti celic CD3+ T. Njihove vrednosti presegajo vsoto celic CD4+ in CD8+, kar nakazuje ekspanzijo običajno maloštevilnih celic CD4–CD8– T. Normalno ta populacija predstavlja do 1 % vseh celic CD3+ T, bolniki z ALPS pa imajo običajno 1–60 % celic DNT. Te celice izločajo velike količine liganda Fas in interlevkina-10 (IL-10). Najverjetneje predstavljajo populacijo starih celic T, ki niso bile izločene z apoptozo. Kljub temu, da so te celice pri ALPS prisotne v večjem številu, pa verjetno niso primarni vzrok za razvoj avtoimunskih fenomenov (4, 13).

Imunološki profili pacientov z ALPS kažejo še številna druga odstopanja. Značilna je relativna limfocitoza celic B in T. Povišane so vrednosti aktiviranih celic T, ki izražajo HLA-DR, ter celic T, ki izražajo CD57. Vrednosti celic ubijalk (NK) so normalne. Vredno-

sti regulatornih celic T (CD4+CD25+) so znižane, prav tako je zmanjšan delež spominskih limfocitov B (CD19+CD27+). Razmerje med celicami T pomagalkami (CD3+CD4+) in citotoksičnimi limfociti T (CD3+CD8+) je znižano. Zelo značilen je citokinski profil Th2 (celice T pomagalke 2) z znižanim *in vitro* izločanjem citokinov Th1: IL-2, IL-12, interferona- γ ter povišanim izločanjem citokinov Th2: IL-4, IL-5 in IL-10. Predvideva se, da je citokinski profil Th2 odgovoren za razvoj avtoimunskih fenomenov pri ALPS (13, 14).

Pogosto je prisotna poliklonska hiperimunoglobulinemija G in A, vrednosti serumskih IgM pa so znižane (5).

Produkcija avtoproteiteles pri ALPS je zelo pogost pojav. Avtoproteitelesa so najpogosteje usmerjena proti eritrocitom in trombocitom, redkeje so prisotna antinevtrofilna, antifosfolipidna in antinuklearna protitelesa ter nizki titri avtoproteiteles proti gladkim mišicam (13, 14).

Kljub dramatičnemu povečanju limfatičnih organov je imunski odziv na okužbe pri bolnikih z ALPS ponavadi dober, vsaj dokler se zapletov bolezni ne začne zdraviti z imunosupresivnimi zdravili. Le redko pride do težje potekajočih oportunističnih okužb (13, 14).

MOLEKULARNA REGULACIJA APOPTOZE LIMFOCITOV

Apoptoza zagotavlja imunsko homeostazo in zmanjša potencialni odziv proti lastnim antigenom tako, da po aktivaciji in ekspanziji limfocitov omeji njihovo akumulacijo. Poznajo dva glavna mehanizma apoptoze – pasivno apoptozo, ki jo sprožijo mitohondrijski mehanizmi po odtegnitvi IL-2, ter aktivno apoptozo, ki se sproži s posebnimi membranskimi receptorji – receptorji smrti. Ti receptorji spadajo v receptorsko superdružino faktorja tumorske nekroze (TNF). Funkcionalna celična domena, imenovana domena smrti (angl. *Death domain, DD*), karakterizira nekatere od teh receptorjev, npr. TNFR-1, TNFR-2, Fas (5).

Fas, imenovan tudi APO-1 oz. CD95, je najbolj poznan receptor smrti in najbolj učinkovit sprožilec apoptoze pri limfocitih. Izražen je na površini limfocitov T in B, ligand Fas pa le na limfocitih T. Aktivacija receptorja Fas ob vezavi liganda Fas se odrazi v trimerizaciji

receptorja. Na intracelularni strani se na DD receptorja smrti s svojimi DD vežejo adaptor-ski proteini, npr. FADD (angl. *Fas associated death domain protein*), ki poleg lastne DD vsebuje tudi efektorske domene smrti (angl. *Death effector domain, DED*). Nastane signalni kompleks DISC (angl. *Death inducing signaling complex*), ki omogoča povezavo FADD s prokaspazo 8 in/ali prokaspazo 10. Prokaspazi se ob formiranju signalnega kompleksa DISC spremenita v aktivno obliko, kaspazo 8 oz. kaspazo 10. Aktivirani kaspazi 8 in 10 nato aktivirata druge efektorske prokaspaze ter tako sprožita kaspazno kaskado, ki vodi v apoptozo (15, 16).

Apoptoza vključuje mnogo beljakovin in je uravnavana na različnih nivojih. Morfološka ali funkcionalna okvara katerega koli izmed proteinov lahko povzroči motnjo apoptoze.

Povezavo med ALPS in moteno apoptozo limfocitov so dokazali s funkcijskim testom učinkovitosti apoptoze. Celice so najprej stimulirali z IL-2, nato so dodali protitelesa proti Fas. Število preživelih celic pri bolnikih z ALPS

je bilo znatno višje kot pri zdravih kontrolah, kar kaže na moteno apoptozo (3).

GENETSKI DEFEKTI V APOPTOTSKI POTI

Pri večini bolnikov gre za mutacijo genov, ki kodirajo proteine poti Fas, tj. mediatorja programirane celične smrti oz. apoptoze. Prva odkritja na tem področju sežejo v leto 1992, ko so odkrili podobnosti med bolniki z ALPS ter mišmi z mutacijami *lpr* in *gld*. Pri miših *lpr* so identificirali transverzijo 768 T-A v genu Fas, posledica katere je substitucija dveh aminokislin v citoplazmatskem delu proteina. Genetski vzrok fenotipa *lpr* je torej avtosomno recesivna mutacija, ki povzroči izjemno znižan delež proteina Fas. Klinično so pri miši *lpr* opazili limfadenopatijo, hipergamaglobulinemijo, prisotna številna avtoprotitelesa in kopičenje celic DNT, podobno kot pri bolnikih z ALPS (34). Kasneje so ugotovili, da gre pri miših *gld* za defekt v FasL, ki se v fizioloških pogojih poveže s Fas in inducira apoptozo. Leta 2004 (Puck in Strauss) je bil predlagan

316

Tabela 1. Klasifikacija avtoimunskega limfoproliferativnega sindroma (ALPS).

	ALPS Ia	ALPS Ib	ALPS II		ALPS III
Mutacija na genu	TNFRSF 6	TNFSF 6	CASP10	CASP8	Neznan
Vrsta mutacije	Najpogosteje gre za mutacije znotraj domene smrti (DD); le-te imajo najvišjo penetranco. Možne so multiple mutacije, ki povzročajo znižano ekspresijo Fas.	84 baznih parov dolga deležja znotraj eksona 4.	Heterozigotne mutacije, substitucije aminokislin.	Homozigotne mutacije.	Ni prisotnih mutacij v aktivaciji apoptotske poti, posredovane s Fas.
Protein	Fas	ligand Fas	Kaspaza 10	Kaspaza 8	Neznan
Posebnosti	Le približno 70 % nosilcev mutacij razvije klinično sliko. Pri bolnikih z ALPS so odkrili tudi mutacije izrezovanja (ležijo na meji med introni in eksoni).	Do sedaj opisan le en primer, pri moškem s sistemskim lupusom eritematosusom in limfadenopatijo; bolnik ni imel povišanih DNT in splenomegalije.	CASP10: Mutacija je povzročila ↓ aktivnost kaspaze in s tem motnjo v apoptotskih kaskadah preko vseh znanih receptorjev. Pri bolnikih je prišlo do težje klinične slike v primerjavi z drugimi tipi ALPS, huda hemolitična anemija, trombocitopenija, optični nevritis in meningitis.	Odkrili pri 2 sorodnikih s ponavljajočimi okužbami zgornjih in spodnjih dihal, okužbami z virusom herpes simplex in nezadostnim imunskim odzivom.	Bolniki imajo klinično sliko, ki močno spominja na ALPS. Obstaja verjetnost, da gre za motnje na ravni drugih receptorjev, zadalženih za apoptozo limfocitov, kot so Trail-R, DR3, DR6.

TNFRSF – družina receptorjev za faktor tumorske nekroze, TNFSF – družina ligandov za faktor tumorske nekroze, CASP 10 – kaspaza 10, CASP 8 – kaspaza 8, DNT – dvojni negativne celice, Trail-R – receptor indukcije apoptoze, povezan s faktorjem tumorske nekroze, DR 3 in DR 4 – receptorja smrti.

klasifikacijski sistem za genotipe bolnikov z ALPS (tabela 1). ALPS Ia vključuje bolnike z mutacijo v genu Fas, ki vodi v motnje izražanja ali funkcionalnosti proteina Fas. Ta tip predstavlja okoli 79% vseh bolnikov z ALPS (25). Bolniki, ki izpolnjujejo klinične in imunološke kriterije za diagnozo ALPS, nimajo pa defekta v genu Fas, imajo lahko prisotne mutacije v katerem koli izmed ostalih genov, ki kodirajo beljakovine, udeležene v apoptotski poti. Pri ALPS Ib gre za mutacijo v genu za FasL. Prva taka mutacija je bila opisana pri odraslem bolniku z atipičnim lupusom (34). Bolniki z diagnozo ALPS in znanim defektom v kaspazah 10 ali 8 sodijo v skupino ALPS II. ALPS III pa vključuje vse bolnike, ki klinično in imunološko izpolnjujejo kriterije za ALPS, genetskih defektov v apoptotskih poteh pa pri njih še nismo odkrili. V študijah so bili opisani tudi primeri bolnikov z nekaterimi lastnostmi ALPS, pri katerih niso uspeli potrditi motnje v apoptozi (20).

NAMEN

Namen naše raziskave je bil razjasniti klinično, imunološko in genetsko ozadje bolnikov z ALPS v Sloveniji. Pri bolnikih, ki smo jih vključili v študijo, smo nameravali ugotoviti klinične in imunološke značilnosti ob prvi prezentaciji bolezni ter v času dolgoročnega spremljanja. Zaradi možnih raznolikih kliničnih manifestacij ALPS smo v raziskavo želeli vključiti tudi bolnike z nepojasnjenimi avtoimunskimi citopenijami, pri katerih so bile ugotovljene imunološke značilnosti ALPS. Poleg tega smo nameravali v Genetskem laboratoriju na Pediatrični kliniki v Ljubljani vpejati metodo za genetsko testiranje pri bolnikih z ALPS, opraviti genetske analize in ugotoviti prisotnost mutacij v genih, ki kodirajo beljakovine, udeležene pri apoptozi imunskih celic.

HIPOTEZE

- pri bolnikih z ALPS se pojavljajo raznolike klinične manifestacije v različnih starostnih obdobjih,
- značilni imunološki izvidi pri bolnikih z ALPS so povišana vrednost IL-10, prisotnost celic DNT nad 1% in motena apoptoza limfocitov *in vitro*,

- najpogostejša genetska okvara pri bolnikih z ALPS v Sloveniji je mutacija v genu za Fas.

METODE

Zasnova raziskave

V raziskavo smo vključili vse bolnike, ki se vodijo na Pediatrični kliniki v Ljubljani pod sumom na ALPS. Vključitveni kriteriji za našo raziskavo so bili: starost pod 18 let, prisotna vsaj ena klinična manifestacija ALPS ter pozitiven vsaj en laboratorijski imunološki test, značilen za ALPS.

Pri načrtovanju raziskave smo upoštevali načela Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku in načela slovenskega Kodeksa medicinske deontologije. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije.

Klinične metode

Retrospektivno smo pregledali vso klinično dokumentacijo o poteku bolezni in pridobili podatke o kliničnih, laboratorijskih in imunoloških značilnostih pri posameznih bolnikih. Za potrebe raziskave smo podatke zbirali v podatkovno zbirko v programu Microsoft Excel. Podatke o kliničnih, laboratorijskih in imunoloških značilnostih smo zbirali od prve prezentacije bolezni (definirane kot datum prvega pregleda plus tri mesece) ter manifestacije, ki so se pojavile v času sledenja bolnika. Čas sledenja je bil definiran kot obdobje od prve prezentacije bolnika do zadnjega pregleda v ambulanti ali na oddelku Pediatrične klinike.

Imunološki testi

Izolacija limfocitov

Mononuklearne celice smo izolirali iz levkocitnega koncentrata z metodo Ficoll-Hypaque.

Limfocitne subpopulacije smo določili tako, da smo levkocitne antigene (antigene CD) na površini limfocitov označili z monoklonskimi protitelesi, označenimi z različnimi fluorokromi. Celice lahko označimo z več monoklonskimi protitelesi hkrati, tako prikazemo, katere kombinacije antigenov izražajo posamezne celice. Na enak način smo določili prisotnost receptorja Fas.

Funkcijski test za apoptozo limfocitov

V prvem koraku limfocite aktiviramo z nameonom povzročitve apoptoze. Nato s pomočjo barvil po 48 urah ločimo apoptotične celice od nekrotičnih, vrednosti smo izmerili na pretočnem citometru.

Določanje citokina IL-10

Vrednosti IL-10 smo določili z encimsko imunskim testom (ELISA).

Genetski testi

Glede na pogostost mutacij pri ALPS smo najprej iskali le-te na genu za Fas, značilne za ALPS tipa Ia. Ker so bili testi pri večini naših bolnikov negativni, smo pregledali še gen za FasL (ALPS Ib).

Izolacija genske DNA

Genomsko DNA smo iz periferne krvi izolirali s setom Flexi Gene DNA isolation kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Izolirano genomsko DNA smo shranili pri 4 °C.

Pomnoževanje fragmentov DNA z verižno reakcijo s polimerazo (metoda PCR)

Vseh 9 eksonov gena za Fas in vse 4 eksone gena za FasL smo ločeno pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo – PCR (angl. *Polymerase Chain Reaction*) na aparatu GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA).

Gelska elektroforeza produktov PCR

Za preverjanje uspešnosti reakcije s PCR in za ocenjevanje koncentracije pomnoženega odseka DNA v reakciji smo uporabljali elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. Po končani elektroforezi smo prisotnost produktov preverili pod UV-svetlobo (305 nm).

Razsoljevanje in koncentriranje DNA s kompletom Quiagen

Raztopino pomnoženega odseka DNA smo očistili in koncentrirali s kompletom QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Določevanje nukleotidnega zaporedja odsekov DNA

Odsekom DNA, ki smo jih pomnožili z reakcijo PCR in nato očistili s kompletom Quiagen, smo določili nukleotidno zaporedje po modificirani Sangerjevi metodi (Sanger et al., 1997).

Analiza sekvenčnih produktov je potekala v napravi ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems, ZDA). Spremembe v nukleotidnem zaporedju smo določili s primerjavo z zaporedjem gena, objavljenega v bazi zaporedij GenBank, ki jo vzdržuje Nacionalni inštitut za zdravje v ZDA (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov>).

REZULTATI

Vključitvene kriterije za raziskavo je izpolnjevalo 11 bolnikov, od tega 7 dečkov in 4 deklice s povprečno starostjo 7,9 let. V tabeli 2 so prikazane klinične manifestacije in rezultati imunoloških testov pri naših bolnikih.

Tp je definirana kot število trombocitov pod $150 \times 10^9/L$, Np je definirana kot delež nevtrofilnih granulocitov pod 0,4, anemija je definirana kot koncentracija Hb pod 120 g/L in monocitoza kot delež monocitov nad 0,1. Normalne vrednosti za IL-10 v serumu so do 10,8 pg/mL, normalne vrednosti celic DNT do 1%. Za imunoglobuline so vrednosti prilagojene glede na starost bolnikov.

Klinične manifestacije

Kriterije za vključitev v našo raziskavo je izpolnjevalo 11 otrok, pri katerih sta bili hkrati prisotni vsaj ena klinična in ena imunološka manifestacija, značilni za ALPS. Pet bolnikov se redno vodi v Službi za alergologijo, revmatologijo in klinično imunologijo, 6 bolnikov pa se vodi na Kliničnem oddelku za hematologijo in onkologijo Pediatrične klinike v Ljubljani. Trije bolniki so izpolnjevali dogovorno sprejete kriterije za diagnozo ALPS, 8 bolnikov pa je hkrati izpolnjevalo eno klinično in eno laboratorijsko merilo za ALPS, vendar niso zadostili dogovorno sprejetim kriterijem za diagnozo ALPS (1–3, 25).

Tabela 2 prikazuje klinične manifestacije pri naših bolnikih v času prve prezentacije bolezni in v času sledenja. Sliki 1 in 2 prikazujeta razporeditev le-teh.

Tabela 2. Prikaz kliničnih manifestacij in imunoloških testov pri naših bolnikih v času prve prezentacije boleznin in v času sledenja.

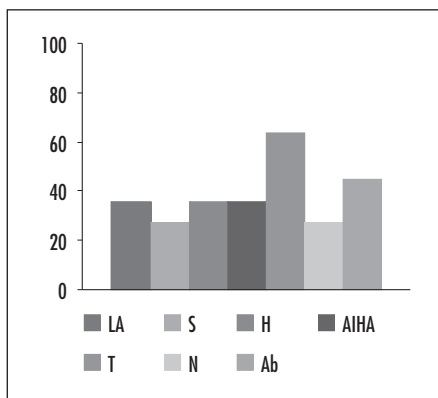
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Prva prezentacija bolezni	Znaki limfoproliferacije	LA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		S	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		H	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	Avtoimunost	AIHA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
		Tp	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
		Np	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		Ab	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
		Drugo	reakcija na cepljenje, ↑ T, urtikarialen izpuščaj		petehije		petehije, bolečine v sklepih		petehije, bolečine v kolenskih, gležnjih	petehije	mastocitoza, sum na celiakijo		petehije
	Imunološki testi	DNT (%)	↑	↑	↑	/	/	/	/	↑	↑	N	↑
		IL-10 (pg/ml)	↑	↑	↑	/	/	/	/	/	↑	/	/
		IgA (g/L)	N	N	N	↑	N	↑	/	N	↓	N	N
		IgG (g/L)	↑	↑	↑	↑	N	↑	/	N	↓	N	↓
		IgM (g/L)	↑	N	↑	N	↑	↑	/	N	↑	N	N
V času sledenja	Znaki limfoproliferacije	LA	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	
		S	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		H	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
		AIHA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Avtoimunost	Tp	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
		Np	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		Ab	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
		Drugo	poliartritis		petehije po celem telesu		petehije, Henoch-Schänlein v sklepih, purpura		petehije, bolečine v kolenskih, gležnjih	petehije	mastocitoza, nevrodermitis, astma		petehije po celem telesu
	Imunološki testi	DNT (%)	N	↑	/	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
		IL-10 (pg/ml)	N	↑	N	↑	N	N	N	/	↑	↑	N
		IgA (g/L)	N	N	N	↑	↑	N	N	/	↓	N	N
		IgG (g/L)	↑	N	N	↑	↑	N	↑	/	↓	N	N
		IgM (g/L)	N	N	↑	N	N	N	N	/	↑	N	N

LA – limfadenopatija, S – splenomegalija, H – hepatomegalija, AIHA – avtoimska hemolitična anemija, Tp – trombocitopenija, Np – nevtropenija, Ab – protitelesa, N – normalna vrednost, B – bolnik, T – telesna temperatura, DNT – dvojno negativne celice T.

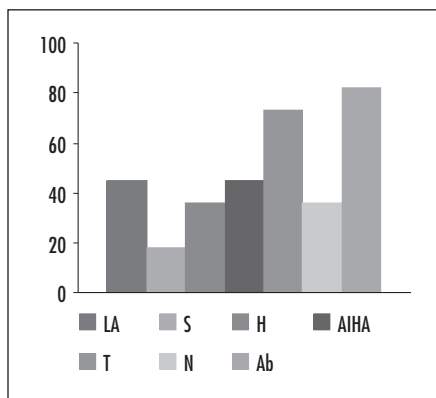
V večini primerov ni prisotnih nobenih avtoimunskih bolezni v družini. Družinske anamneze so večinoma brez posebnosti. Pri bolniku 3 je bil pri materi v nosečnosti ugotovljen latentni lues, po očetovi strani je prisotna sladkorna bolezen tipa I. Pri bolniku 10

ima mati vitiligo, težave s ščitnico, alergijo na kovine ter boleče male sklepe rok.

Spremljali smo tudi razvoj otroka. Pri nobenem od naših bolnikov v razvoju nismo opazili nepravilnosti.



Slika 1. Klinične manifestacije ob prvi prezentaciji bolezni. LA – limfadenopatija, H – hepatomegalija, S – splenomegalija, T – trombocitopenija, AIHA – avtoimunska hemolitična anemija, N – nevtropenija, Ab – protitelesa.



Slika 2. Klinične manifestacije v času sledenja bolnikov. LA – limfadenopatija, H – hepatomegalija, S – splenomegalija, T – trombocitopenija, AIHA – avtoimunska hemolitična anemija, N – nevtropenija, Ab – protitelesa.

Pri večini bolnikov smo v času sledenja opazili, da so velikokrat prebolevali okužbe. Pri 8/11 bolnikov je šlo za okužbe respiratornega trakta, pri 3/11 za okužbe gastrointestinalnega trakta. Bolnik 3 je preboleval hudo okužbo z virusom CMV, ki se je pojavila v času zdravljenja z visokimi odmerki sistemskih kortikosteroidov in mifofenolat mofetilom.

Večina bolnikov (91 %) je bila v času sledenja na terapiji z imunosupresijskimi zdravili. 9 bolnikov (82 %) je dobivalo sistemski kortikosteroid metilprednizolon *per os*, 64 % je dobivalo intravenske imunoglobuline, 27 % bolnikov je prejelo intravensko terapijo z monoklonskim protitelesom proti CD20 (rituximab), dva bolnika (18 %) sta dobivala mifofenolat mofetil *per os* in en bolnik metotreksat *per os*.

Imunološki testi

Vrednosti celic DNT nad 1 % so imeli vsi bolniki iz naše kohorte (100 %). Ob prvi prezentaciji bolezni je imelo 6 bolnikov (55 %) povišane vrednosti celic DNT, ob zadnjem testiranju je imelo 9 bolnikov vrednosti celic DNT povišane (82 %), en je imel normalne vrednosti, pri enem testa nismo ponovili (tabela 2).

Vrednosti IL-10 so imeli ob prvi prezentaciji povišane vsi bolniki, pri katerih je bil test opravljen. Ob zadnjem testu so imeli IL-10 povišan štirje bolniki (36 %), najbolj bol-

nik 10. Vrednosti IgA sta imela ob prvi prezentaciji povišane dva bolnika, ob zadnjih preiskavah sta imela prav tako povišane vrednosti dva bolnika (18 %). IgG je imelo ob prvi prezentaciji povišane 6 bolnikov (55 %), ob zadnjih preiskavah pa štirje (36 %). Noben bolnik ni imel znižanih vrednosti IgM.

Vrednosti limfocitov T (CD3+) je imel ob prvi prezentaciji bolezni povišane le en bolnik (bolnik 9), ob zadnjih preiskavah pa sta imela povišane vrednosti dva bolnika. Celice T pomagalke (CD3+CD4+) so bile ob prvi prezentaciji znižane pri petih bolnikih, ob zadnjem testiranju so imeli štirje bolniki nižje vrednosti. Ob pojavu bolezni je imelo pet bolnikov povišane vrednosti citotoksičnih limfocitov (CD3+CD8+), razmerje med celicami CD3+CD4+ in CD3+CD8+ je imelo pet bolnikov znižano. Ob zadnjem testiranju je imel le 1 bolnik povišane vrednosti celic CD3+CD8+, znižano razmerje med celicami CD3+CD4+ in CD3+CD8+ sta imela ob zadnjem testu dva bolnika. Vrednosti celic CD3+HLA-DR+ sta ob prvi prezentaciji imela povišane dva bolnika, ob zadnjem testiranju so bile vrednosti povišane pri dveh bolnikih. Vrednosti limfocitov B so pri večini bolnikov v mejah normale, enako tudi vrednosti celic NK.

Apoptoza je okvarjena pri treh bolnikih (bolnik 1, 3 in 4), pri ostalih *in vitro* test apoptoze ne odstopa od normale. Receptor Fas je

bil primerno izražen na površini limfocitov T pri vseh bolnikih.

Genetski testi

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za pomnoževanje eksonov gena za Fas in FasL, smo izbrali z internetnim orodjem (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), tako da je posamezen par začetnih oligonukleotidov vključeval celoten ekson (dva eksona) in pripadajoče eksonsko intronske regije.

Genetske analize gena za Fas in FasL smo opravili pri 6 bolnikih. Šest bolnikov (bolniki 1, 2, 3, 5, 8 in 9) je bilo testiranih za mutacijo gena, ki kodira receptor Fas, in štirje bolniki (bolniki 1, 2, 3 in 9) za mutacijo gena, ki kodira ligand Fas. Mutacije nismo dokazali. Tudi pri ostalih bolnikih nismo našli sprememb nukleotidnih zaporedij v genih za Fas in FasL.

Trenutno potekajo nadaljnje analize genov za Fas in FasL pri ostalih petih bolnikih.

RAZPRAVLJANJE

ALPS je redka primarna imunska pomanjkljivost, za katero je značilna motnja v nadzoru imunskega odziva. Klinična slika bolezni je bila prvič opisana leta 1969, šele v zadnjem desetletju pa so natančneje opredelili imunske in genetske značilnosti pri tem sindromu. Kljub izrazitemu napredku v zadnjih letih povezava med genotipom in fenotipom pri bolnikih z ALPS še vedno ni povsem pojasnjena. Pri večjem delu bolnikov s klinično sliko ALPS tako še vedno ne poznamo natančnega genetskega vzroka bolezni, po drugi strani pa so za ALPS tipične genetske okvare opisali tudi pri bolnikih z neznačilnim potekom bolezni. Večina raziskav pri bolnikih z ALPS je bila opravljena v razvitih državah zahodne Evrope in ZDA, naša raziskava pa je prva sistematična analiza kliničnih, imunoloških in genetskih značilnosti pri bolnikih s sumom na ALPS v Sloveniji.

V raziskavo smo vključili vse otroke, ki so izpolnjevali vsaj eno klinično in eno imunološko merilo za diagnozo ALPS. Skupno smo na Pediatrični kliniki v Ljubljani odkrili 11 otrok, ki so izpolnjevali omenjene vključitvene kriterije. V objavljenih raziskavah so

bili znaki limfoproliferacije med najpogostejšimi kliničnimi manifestacijami pri bolnikih z ALPS. Pri večini bolnikov, opisanih v študijah, gre za kronično obliko limfoproliferacije. V naši raziskavi smo pri 7 bolnikih (64%) potrdili prisotnost ene od oblik limfoproliferacije. Pri 6 bolnikih (55%) so bili znaki limfoproliferacije prisotni že v času prve prezentacije bolezni in le pri enem bolniku je v času sledenja prišlo do izboljšanja. Najpogosteje se je pojavljala limfadenopatija, pri čemer so bile pri večini bolnikov povečane vratne, pazdušne in dimeljske bezgavke. Poleg povečanih bezgavk smo kot znak limfoproliferacije ugotovili tudi hepatomegalijo pri približno eni tretjini bolnikov in splenomegalijo pri eni četrtini vseh bolnikov. V diferencialno diagnozo limfoproliferacije sodijo maligna obolenja, ki se pri bolnikih z ALPS pojavljajo pogosteje kot v zdravi populaciji. Zato smo pri 4 bolnikih (bolniki 2, 3, 4 in 9) opravili aspiracijsko biopsijo povečanih bezgavk in pri vseh štirih je bilo potrjeno, da ne gre za maligno spremenjene bezgavke.

Med imunološkimi testi smo pri naših bolnikih spremljali delež celic DNT v periferni krvi, vrednost serumskega IL-10 in funkcijski test apoptoze. Pri vseh 11 bolnikih smo odkrili povišane vrednosti celic DNT. Opazili smo, da je bil v skupini 8 bolnikov, ki niso izpolnjevali dogovornih kriterijev za ALPS, razpon vrednosti celic DNT celo večji kot pri ostalih 3 bolnikih, ki so izpolnjevali dogovorne kriterije za ALPS. Pri bolniku 1 smo v času sledenja opazili upad celic DNT, kar lahko morda pripišemo dejstvu, da je prejemal zdravljenje s sistemskimi glukokortikosteroidi. Samo na podlagi vrednosti celic DNT torej ne moremo potrditi ali ovreči suma na ALPS, je pa pomemben orientacijski test, predvsem za bolnike, ki imajo izražene le posamezne klinične manifestacije ALPS.

Za celice DNT je značilno, da izločajo velike količine IL-10, zato imajo bolniki z ALPS običajno povišane vrednosti IL-10. Šest bolnikov v naši kohorti je imelo povišane vrednosti IL-10, ob tem so imeli hkrati povišane tudi vrednosti celic DNT. Najbolj izstopa vrednost pri bolniku 10, ki je imel v času testiranja zagon bolezni, kar lahko razložimo z dejstvom, da vrednost IL-10 v drugi fazi močnega vnetja močno naraste. Pri 5 bolnikih,

ki so imeli povišane vrednosti celic DNT, smo ugotovili normalne vrednosti IL-10, kar ne kaže na neposredno povezavo med vrednostjo celic DNT in nivojem IL-10 v serumu.

Vloga celic DNT pri razvoju avtoimunskih fenomenov še ni popolnoma jasna. Po nekaterih domnevah naj ne bi bile primarni vzrok za razvoj avtoimunskih fenomenov, po drugih pa bi celice DNT lahko sprožale avtoimunski odziv. V naši raziskavi nismo ugotovili povezave med vrednostjo celic DNT in intenzivnostjo avtoimunskih manifestacij. Glede na hipoteze, da je citokinski profil Th2 odgovoren za razvoj avtoimunskih fenomenov pri ALPS, smo ugotavljali povezavo med vrednostjo IL-10 in prisotnostjo ter intenzivnostjo avtoimunskih manifestacij. Opazili smo, da se pri bolnikih, ki imajo višje vrednosti IL-10, nekoliko pogosteje pojavijo avtoimunski fenomeni.

Po dogovornih kriterijih je za diagnozo ALPS zelo pomemben funkcijski test apoptoze limfocitov. Z njim se preveri učinkovitost apoptoze, sprožene z aktivacijo Fas-FasL poti. Če test pokaže okvarjeno apoptozo, lahko z gotovostjo trdimo, da ima bolnik ALPS. Kadar pa test ne pokaže okvare apoptoze, pa to ne izključuje diagnoze ALPS, temveč samo kaže, da pri bolniku ne gre za okvaro apoptotične poti, posredovane s Fas-FasL. Apoptoza namreč lahko poteka po različnih poteh. Glede na rezultate naših testov lahko potrdimo bolezen pri treh bolnikih, in sicer pri bolniku 1, 3 in 4. Pri ostalih 8 bolnikih zaradi primerne testa apoptoze Fas-FasL ne moremo z gotovostjo potrditi diagnoze ALPS, kljub temu, da imajo klinične in imunološke značilnosti ALPS. Domnevamo, da gre pri teh bolnikih lahko za motnjo na kateri izmed drugih poti apoptoze in ne na poti, posredovani s Fas-FasL.

Naši podatki potrjujejo delovno hipotezo glede značilnih imunoloških izvidov pri ALPS, vendar pri vseh bolnikih nismo ugotovili vseh imunoloških manifestacij, kar pomeni, da je potrebno pri vsakem bolniku s sumom na ALPS opraviti vse preiskave in da ni samo enega imunološkega testa, ki bi potrjeval diagnozo pri vseh bolnikih. Kadar so hkrati prisotni značilni imunološki izvidi, tj. povišana vrednost IL-10, prisotnost več kot 1 % celic DNT in motena apoptoza limfocitov *in vitro*, le-ti

močno govorijo v prid diagnoze ALPS. Naši rezultati nakazujejo, da na izvid imunoloških testov lahko vpliva aktivnost oz. trajanje bolezni, prav tako pa še ne vemo natančno, kako na izid testov vpliva zdravljenje z različnimi imunosupresijskimi zdravili.

Apoptoza nadzira jakost in trajanje anti-genško specifičnega imunskega odziva tako, da omejuje življenjsko dobo perifernih limfocitov B in T ter izloča avtoreaktivne T-celične klonе. Motena apoptoza limfocitov T ima za posledico ekspanzijo aktiviranih T-celičnih in DNT-celičnih populacij, motena apoptoza limfocitov B pa skupaj z visokimi vrednostmi IL-10 posreduje hipergamaglobulinemijo ter daljše preživetje celic B, ki tvorijo avtoprotelesa.

Rezultati naše raziskave presenetljivo kažejo znižane vrednosti limfocitov T v času sledenja kar pri petih bolnikih, le pri treh smo v času sledenja opazili povišane vrednosti limfocitov T. Vrednosti limfocitov B ne odstopajo od normalnih. Pričakovali smo povišane vrednosti citotoksičnih limfocitov T, kar je pet bolnikov iz naše kohorte tudi imelo. Pet bolnikov je imelo tudi značilno znižano razmerje med celicami T pomagalkami in citotoksičnimi limfociti T. Opazili smo povezavo med povišanimi vrednostmi limfocitov T in limfoproliferacijo. Pri bolnikih s povišanimi vrednostmi limfocitov T je bila pogosteje prisotna limfadenopatija, splenomegalija ter hepatomegalija. Podobno smo opazili povezavo med vrednostjo celic DNT in limfoproliferacijo. Bolniki z višjimi vrednostmi celic DNT imajo pogosteje limfadenopatijo, splenomegalijo ter hepatomegalijo, bolniki z nižjimi vrednostmi celic DNT pa redkeje razvijejo znake limfoproliferacije.

Pri treh bolnikih smo opazili povišane vrednosti IgA, vrednosti IgG so bile v času sledenja povišane pri 8 bolnikih. Presenetljivo so bile povišane vrednosti IgM kar pri 5 bolnikih, pri nikomer pa nismo zasledili znižanih vrednosti IgM.

Receptor Fas je primerno izražen na površini limfocitov pri vseh naših bolnikih. Ta ugotovitev se ujema z rezultati genetskih testov, saj nismo pri nobenem testiranem bolniku ugotovili mutacije gena za receptor Fas, ki bi lahko pripeljala do motnje izražanja ali funkcionalnosti proteina Fas.

Poleg spoznanj o patogenezi avtoimunskih boleznih in poznanih mehanizmov apoptoze imunskih celic so napredki v molekularni biologiji in tehnologiji DNA močno pripomogli k spoznavanju mehanizmov v celicah, ki so pomembni za nadzor in normalen potek apoptotske poti. Pretekle raziskave so bile v veliki meri osredotočene na proučevanje mehanizma apoptoze, posredovane s Fas. Z genetskimi metodami so pri večini bolnikov z ALPS ali sumom na to bolezen našli mutacije na genu za Fas (ALPS tipa Ia). Opisanih je že več kot 107 različnih mutacij tega gena, ki se praviloma dedujejo avtosomno dominantno. Večinoma se te pojavljajo na eksonu 9 in vplivajo na strukturo in delovanje znotraj-celičnega dela proteina Fas. Nekaj let kasneje so odkrili, da se mutacije lahko pojavljajo tudi znotraj intronov gena in te zmotijo proces izrezovanja RNA (25).

Pri naši raziskavi smo se odločili, da najprej opravimo testiranje na genu za Fas, ki je pri bolnikih z ALPS najpogosteje mutiran. Pregledali smo vse eksone in eksonsko intronske regije gena, še posebej smo bili pozorni na transmembransko domeno proteina, v kateri je bilo opisanih največ mutacij. Do sedaj so bila testiranja opravljena pri 6 bolnikih in vsi testi so bili negativni.

V apoptotsko pot, posredovano s Fas, je vpletenih več beljakovin. Mutacija gena katere koli od teh beljakovin lahko povzroči ALPS. Tako smo nadaljevali s testiranjem gena za FasL. Do sedaj je bil opisan le en primer mutacije tega gena, ki je ustrežal tipu ALPS Ib, in sicer pri moškem s sistemskim eritematoznim lupusom (SLE) (35). Leta 2006 so odkrili novo homozigotno mutacijo gena za FasL. Pri bolnici z generalizirano limfadenopatijo, masivno splenomegalijo in perzistentno hipergamaglobulinemijo ter s ponavljajočimi okužbami dihal in srednjega ušesa so našli mutacijo na eksonu 4, kjer je prišlo do substitucije dveh aminokislilin (iz alanina v glutamat). Po klinični sliki spada bolnica v ALPS tipa I, a se homozigotna mutacija FasL ne ujema z mutacijo pri ALPS tipa Ia, odsotnost SLE pa ne z ALPS tipa Ib. Tako so bolnico uvrstili v nov tip, ALPS Ic (37). Glede na podobnost klinične in imunološke slike med nekaterimi našimi bolniki in omenjeno bolnico smo predvidevali, da so možne mutacije na genu za FasL.

Pregledali smo vse štiri eksone in eksonsko intronske regije gena pri štirih bolnikih, vendar mutacij nismo odkrili.

Na podlagi izvidov opravljenih genetskih testov lahko ovrzemo delovno hipotezo, da je najpogostejša genetska okvara pri bolnikih z ALPS v Sloveniji mutacija v genu za Fas. Ker v Sloveniji še ni bilo narejenih podobnih študij, smo se zgledovali po doslej opravljenih. Med približno 200 bolniki z ALPS v svetu je kar 79 % takih, pri katerih so našli mutacije na genu za Fas (25). Vzrokov, zakaj mutacij na tem mestu pri naših bolnikih nismo našli, je lahko več. Možno je, da gre pri katerem od naših bolnikov za somatsko mutacijo gena za Fas. Leta 2004 so tako mutacijo našli pri 6 bolnikih z značilno klinično in imunološko sliko ALPS (7). Mutacijo so odkrili po pregledu genetskega materiala celic DNT. Druga možnost je genetska heterogenost v splošni populaciji, pri čemer moramo upoštevati, da so bile študije večinoma opravljene v ZDA in državah zahodne Evrope, medtem ko ni podatkov o genetskem ozadju pri bolnikih z ALPS iz držav vzhodnega in osrednjega dela Evrope, pri katerih bi pričakovali večjo genetsko primerljivost z bolniki v Sloveniji. Domnevamo, da so mutacije pri naših bolnikih lahko prisotne drugje. Opisani so posamezni primeri mutacij genov za kaspazo-10 in kaspazo-8. Oba proteina sta vključena v apoptotsko pot, posredovano s Fas. Ni pa nujno, da ALPS povzročajo samo defekti poti Fas. Možno je, da gre za motnjo na ravni drugih receptorjev, zadolženih za apoptozo limfocitov. Tako bodo potrebne še številne nove raziskave, ki bi odkrile možne nepravilnosti na teh receptorjih, pa tudi na ligandih in signalnih molekulah, ki sodelujejo v procesih apoptoze imunskih celic, in s tem omogočile še boljše razumevanje molekularnih mehanizmov, ki kontrolirajo proces avtoimunske proliferacije.

V prihodnosti je potrebno dokončati genetsko analizo pri vseh 11 bolnikih in ugotoviti mesto mutacije. Vključiti je potrebno nove bolnike, da bi bil vzorec bolj reprezentativen; v raziskavo je treba vključiti še bolnike iz ostalih pediatričnih imunoloških centrov v centralni in jugovzhodni Evropi ter na ta način pridobiti podatke o genetski heterogenosti v nam bližjem vzorcu.

Na podlagi izsledkov naše raziskave predlagamo sledeči protokol preiskav pri bolniku s sumom na ALPS:

- temeljit klinični pregled, pri čemer smo posebej pozorni na prisotnost limfadenopatije, splenomegalije, hepatomegalije in prisotnost avtoimunskih manifestacij (avtoimunska hemolitična anemija, trombocitopenija, nevtropenija, itd.). Pri vsakem posameznem bolniku je potrebno oceniti smiselnost dodatnih patohistoloških preiskav, kot npr. biopsija bezgavke ali jeter;
- krvne preiskave vključno s hemogramom, diferencialno krvno sliko, osnovne biokemične preiskave, pregled urina, določitev prisotnosti avtoprotiteles (Coombsov test, ANA, RF, aCL, LA), celokupne serumske IgG/A/M, določitev limfocitnih subpopulacij in posebej določitev vrednosti celic DNT, serumsko vrednost IL-10 in funkcijski test apoptoze limfocitov, posredovane s Fas;
- genetski testi za testiranje Fas-FasL in v primeru negativnih izvidov dodatne preiskave za izključitev mutacij v ostalih genih, kot npr. geni za kaspazo 10, TNFRSF6 in drugi.

ZAKLJUČEK

Na podlagi naših rezultatov lahko rečemo, da ima ALPS zelo raznoliko klinično prezentacijo, ki se pogosto ne izrazi ob prvem pojavu bolezni, ampak tekom let. Značilni imunološki testi so povišana vrednost IL-10, prisotnost več kot 1 % celic DNT in motena apoptoza limfocitov *in vitro*. Nobeden od teh testov ni pozitiven pri vseh bolnikih, zato je potrebno napraviti celotno serijo testov. Genetske analize ne kažejo, da je najpogostejša mutacija gena za Fas pri bolnikih z ALPS v Sloveniji.

ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Tadeju Avčinu, dr. med., za prijazno usmerjanje in vzpodbude ter somentorici dr. Maruši Debeljak, univ. dipl. biol., za vso strokovno pomoč pri opravljanju genetskega dela.

LITERATURA

1. Sneller MC, Wang J, Dale JK, et al. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 1997; 89: 1341–8.
2. Alvarado CS, Straus SE, Li S, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: A cause of chronic splenomegaly, lymphadenopathy, and cytopenias in children – Report on diagnosis and management of five patients. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43: 164–9.
3. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: The autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Int Med* 1999; 130: 591–601.
4. Lopatin U, Yao X, Williams RK, et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood* 2001; 97: 3161–70.
5. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 325–31.
6. Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Brit J Haem* 2006; 133: 124–40.
7. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 2004; 351: 1409–18.
8. Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, et al. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 2005; 105: 2443–8.
9. Wang W, Herrod H, Pui C-H, et al. Immunoregulatory abnormalities in Evans' syndrome. *Am J Hematol* 1983; 15: 381–90.
10. Savasan S, Warrior I, Ravindranath Y. The spectrum of Evans' syndrome. *Arch Dis Child* 1997; 77: 245–8.
11. Hamidah A, Thambidorai CR, Jamal R. Prolonged remission after splenectomy for refractory Evans syndrome – a case report and literature review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36 (3): 762–4.
12. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Gas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001; 98: 194–200.
13. Bleesing JH, Brown MR, Straus SE, et al. Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2001; 98: 2466–73.

14. Fuss IJ, Strober W, Dale JK, et al. Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humor autoimmunity. *J Immunol* 1997; 158: 1912–8.
15. Chinnaiyan AM, Dixit VM. Portrait of an executioner: the molecular mechanism of FAS/APO-1-induced apoptosis. *Semin Immunol* 1997; 9: 69–76.
16. Wang J, Zheng L, Lobito A, et al. Inherited human caspase-10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome, type II. *Cell* 1999; 98: 47–58.
17. Siegel RM, Fleisher TA. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 5: 729–38.
18. Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P, et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 2006; 91: 538–41.
19. Gualco G, van den Berg A, Koompas S, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with a minimal deletion in the death domain of the FAS gene. *Human pathology* 2008; 39: 137–41.
20. Dianzani U, Chiocchetti A, Ramenghi U, et al. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences* 2003; 72: 2803–24.
21. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10: 124–33.
22. Rössler J, Enders A, Lahr G, et al. Identical phenotype in patients with somatic and germline CD 95 mutations requires a new diagnostic approach to autoimmune lymphoproliferative syndrome. *The Journal of Pediatrics* 2005; 147: 691–4.
23. Blessing JJH. Sorting out the causes of ALPS. *The Journal of Pediatrics* 2005; 147: 571–4.
24. Ster M, Buser AS, Lohri A, et al. Autoimmunity and malignancy in hematology – More than association. *Oncology/Hematology* 2007; 63: 100–10.
25. Puck JM, Rieux-Laucat F, Le Deist F, et al. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In: Ochs CD, Smith ECI, Puck JM, eds. *Primary immunodeficiency diseases: a molecular and cellular approach*. 2nd ed. USA: Oxford University Press; 2006. p. 326–41.
26. Evans EJ, Hene L, Sparks LM, et al. The T Cell Surface-How Well Do We Know It? *Immunity* 2003; 19 (2): 213–23.
27. Peters AMJ, Kohfin B, Martin H, et al. Defective apoptosis due to a point mutation in the death domain of CD95 associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome, T-cell lymphoma, and Hodgkin's disease. *Experimental Hematology* 1999; 27 (5): 868–74.
28. Jackson CE, Fisher RE, Hsu AP, et al. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective Fas: Genotype Influences Penetrance. *The American Journal of Human Genetics* 1999; 64 (4): 1002–14.
29. Infante AJ, Britton HA, DeNapoli T, et al. The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *The Journal of Pediatrics* 1998; 133 (5): 629–33.
30. Hünig T, Schimpl A. Systemic autoimmune disease as a consequence of defective lymphocyte death. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9 (6): 826–30.
31. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356 (6367): 314–7.
32. Wu J, Wilson J, He J, et al. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996; 98: 1107–13.
33. Chun HJ, Zheng L, Ahmed M, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase 8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002; 419: 395–9.
34. Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, et al. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2006; 108(4). Dosegljivo na: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/108/4/1306>

Prispelo 3. 2. 2009