

Kongenitalne neutropenije u djece

Pučić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:829186>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Pučić

Kongenitalne neutropenije u djece

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Ernesta Bilića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

POPIS KRATICA

ABN - apsolutni broj neutrofila

ACKR1 - atipični kemokinski receptor 1 (engl. atypical chemokine receptor 1)

AD - autosomno dominantno

ADAN - neutropenija povezana s ACKR1/DARC (engl. ACKR1/DARC-associated neutropenia)

AIN - autoimuna neutropenija

ALPS - autoimuni limfoproliferativni sindrom (engl. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome)

AML - akutna mijeloična leukemija (engl. Acute Myeloid Leukemia)

ANA - antinuklearna antitijela

AR - autosomno recesivno

CMV - citomegalovirus

CRISPR/Cas9 - engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9

CRP - C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein)

CSF3R - receptor za faktor stimulacije kolonija 3 (engl. Colony stimulating factor 3 receptor)

CVID - zajednička varijabilna imunodeficijencija (engl. Common Variable Immunodeficiency)

CyN - ciklička neutropenija (engl. cyclic neutropenia)

DARC - receptor za Duffy antigen/kemokin (engl. Duffy antigen/chemokine receptor)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

ds-DNA - dvolančana DNA (engl. double-stranded DNA)

EBMT - Europski registar transplantacije koštane srži (engl. European Bone Marrow Transplantation)

EBV - Epstein-Barr virus

ENA - ekstraktibilni nuklearni antigeni (engl. Extractable Nuclear Antigens)

ER - endoplazmatski retikulum

FT3 - slobodni trijodtironin (engl. free triiodothyronine)

FT4 - slobodni tiroksin (engl. free thyroxine)

G-CSF - čimbenik rasta granulocitnih kolonija (engl. granulocyte colony-stimulating factor)

G-CSFR - receptor za čimbenik rasta granulocitnih kolonija (engl. granulocyte colony-stimulating factor receptor)

GM-CSF - čimbenik rasta granulocitnih i makrofagnih kolonija (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GvHD - reakcija transplantata protiv primatelja (engl. Graft-versus-Host Disease)

HepB - hepatitis B virus

HepC - hepatitis C virus

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. Human Immunodeficiency Virus)

HPV - humani papiloma virus (engl. human papillomavirus)

HSCT - alogena transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (engl. Hematopoietic Stem Cell Transplantation)

IL-3 - interleukin 3

IN - idiopatska neutropenija

iPCS - inducirane pluripotentne matične stanice (engl. induced pluripotent stem cells)

KN - kongenitalne neutropenije

LL-Np - engl. long lasting neutropenia

LO-Np - engl. late onset neutropenia

MDS - mijelodisplastični sindrom (engl. myelodysplastic syndrome)

NE - neutrofilna elastaza

NK - prirodne stanice ubojice (engl. natural killer)

PML - protein promijelocitne leukemije (engl. Promyelocytic Leukemia Protein)

RF - reumatoidni faktor

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)

RUNX1 - engl. Runt-related transcription factor 1

SBDS - engl. Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome

SGLT2 - engl. sodium-glucose cotransporter 2

tTG-IgA - transglutaminaza-2 specifična za tkivo IgA (engl. tissue transglutaminase IgA)

TG - tireoglobulin

TKN - teška kongenitalna neutropenija

TNF α - faktor tumorske nekroze alfa (engl. tumor necrosis factor α)

TP53 - tumor protein p53

TPO - tireoperoksidaza

TSH - tireotropin (engl. thyroid-stimulating hormone)

UPR - engl. unfolded protein response

WES - sekvenciranje cijelog egzoma (engl. whole-exome sequencing)

WGS - sekvenciranje cijelog genoma (engl. whole-genome sequencing)

WHIM - sindrom bradavica, hipogamaglobulinemije, infekcija i mijelokateksije (engl. Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis syndrome)

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. Neutrofili.....	1
1.2. Neutropenije.....	2
1.2.1. Definicija.....	2
1.2.2. Klasifikacija.....	3
2. DIJAGNOSTIKA NEUTROPENIJA U DJECE.....	4
2.1. Osobna anamneza.....	4
2.2. Obiteljska anamneza.....	5
2.3. Klinički pregled.....	6
2.4. Dijagnostički postupci.....	7
Dijagnostički postupci prve linije.....	8
Dijagnostički postupci druge linije.....	9
Pregled koštane srži.....	9
Genetsko testiranje.....	11
3. STEČENE NEUTROPENIJE.....	14
4. VJEROJATNO STEČENE NEUTROPENIJE.....	15
5. KONGENITALNE NEUTROPENIJE (KN).....	16
5.1. Definicija.....	16
5.2. Epidemiologija.....	17
5.3. Klasifikacija.....	18
5.4. Klinička slika.....	26
5.5. Molekularna pozadina nekih kliničkih entiteta.....	28
5.5.1. Defekti granula.....	28
ELANE mutacije - Teška kongenitalna neutropenija (TKN) i ciklička neutropenija (CyN).....	28
5.5.2. Regulacija apoptoze i staničnog ciklusa.....	33

HAX1 mutacije - Kostmannov sindrom	33
STK4 mutacija	35
TAFAZZIN gen mutacija: Barthov sindrom	35
5.5.3. Regulatori neutrofilnog otpuštanja iz koštane srži.....	37
CXCR4 i CXCR2 mutacije - WHIM sindrom	37
5.5.4. Transporteri	38
Mutacije gena SLC37A4 - Glikogenoza tip 1b	38
5.6. Liječenje.....	40
5.6.1. G-CSF.....	40
5.6.2. Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (HSCT) kod pacijenata s teškim kongenitalnim neutropenijama.....	43
5.6.3. Ostale terapijske opcije.....	45
5.6.4. Zbrinjavanje akutnih infekcija.....	46
5.6.5. Prevencija infekcija i antimikrobna profilaksa.....	47
5.7. Transformacija u MDS/AML	48
5.7.1. CSF3R mutacija.....	49
5.7.2. RUNX1 mutacija	50
5.8. Follow-up i prognoza.....	52
6. ZAHVALE	54
7. LITERATURA.....	55
8. ŽIVOTOPIS	72

SAŽETAK

KONGENITALNE NEUTROPENIJE U DJECE

Maja Pučić

Kongenitalne neutropenije su skupina rijetkih nasljednih bolesti uzrokovanih mutacijama u genima važnim za proizvodnju, sazrijevanje i otpuštanje neutrofila iz koštane srži. Očituju se smanjenjem apsolutnog broja neutrofila (ABN) u perifernoj krvi ispod normalnih vrijednosti i posljedično povećanom učestalošću i težinom infekcija, često već u ranom djetinjstvu. Najčešći uzrok kongenitalnih neutropenija je autosomno dominantna mutacija gena ELANE. Zahvaljujući sve većoj dostupnosti različitih metoda genomskog sekvenciranja, broj mutacija uzročno povezanih s razvojem kongenitalnih neutropenija i dalje raste. Kongenitalne neutropenije mogu se javiti kao izoliran poremećaj ili kao dio različitih genetskih bolesti sa širokim spektrom ekstrahematoloških manifestacija. Uz antibiotike, G-CSF danas predstavlja prvu liniju liječenja pacijenata s kongenitalnom neutropenijom. Njegova primjena u ovu svrhu značajno je smanjila mortalitet i poboljšala kvalitetu života pacijenata. Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica ostaje rezervirana za pacijente kod kojih primjena G-CSF-a nije adekvantna ili pacijent ne pokazuje dostatan odgovor. Alternativne terapijske opcije za specifične podtipove kongenitalnih neutropenija još traže svoje mjesto u široj primjeni, ali pokazuju obećavajući potencijal. Zbog povećane učestalosti transformacije u MDS ili AML, mnogi autori kongenitalne neutropenije smatraju preleukemijskim stanjem. Ta sklonost pripisuje se stečenim citogenetičkim promjenama i stečenim somatskim mutacijama u različitim genima od kojih su najbolje poznate mutacije gena CSF3R i RUNX1. Ipak, svi faktori uključeni u ovaj složeni proces i njihova kompleksna interakcija i dalje su predmet istraživanja. Većina djece s teškom kongenitalnom neutropenijom i stabilnim vrijednostima ABN-a danas doživi odraslu dob. Sve veći izbor dijagnostičkih i terapijskih mogućnosti ulijeva nadu u daljnje poboljšanje ishoda.

Ključne riječi: kongenitalne neutropenije, učestale infekcije, ELANE mutacija, G-CSF

SUMMARY

CONGENITAL NEUTROPENIAS IN CHILDREN

Maja Pučić

Congenital neutropenias are a group of rare hereditary diseases caused by mutations in genes crucial for the production, maturation, and release of neutrophils from the bone marrow. They manifest as a reduction in the absolute number of neutrophils (ANC) in peripheral blood below normal values, consequently leading to an increased frequency and severity of infections, often starting in early childhood. The most common cause of congenital neutropenias is an autosomal dominant mutation in the ELANE gene. With the increasing availability of various genomic sequencing methods, the number of mutations causally linked to the development of congenital neutropenias continues to grow. Congenital neutropenias can present as isolated disorders or as part of various genetic diseases with a wide range of extrahematologic manifestations. In addition to antibiotics, G-CSF currently represents the first line of treatment for patients with congenital neutropenia. Its use for this purpose has significantly reduced mortality and improved the quality of life for patients. Hematopoietic stem cell transplantation remains reserved for patients for whom G-CSF treatment is inadequate or who do not show a sufficient response. Alternative therapeutic options for specific subtypes of congenital neutropenias are still seeking broader application but show promising potential. Due to the increased frequency of transformation into MDS or AML, many authors consider congenital neutropenias to be pre-leukemic conditions. This tendency is attributed to acquired cytogenetic changes and somatic mutations in various genes, most notably mutations in the CSF3R and RUNX1 genes. However, all factors involved in this complex process and their interactions remain subjects of ongoing research. Most children with severe congenital neutropenia and stable ANC values reach adulthood today. The growing range of diagnostic and therapeutic options provides hope for further improvement in outcomes.

Keywords: congenital neutropenias, frequent infections, ELANE mutation, G-CSF

1. UVOD

U svrhu isticanje važnosti neutrofila u obrani organizma od patogena i njihovih višestrukih uloga u imunološkom sustavu, u ovom preglednom radu bit će prikazani uzroci, dijagnostika, posljedice i zbrinjavanje manjka neutrofila u krvi. Rad će se fokusirati na kongenitalne neutropenije, ali će ukratko biti opisani i drugi znatno češći tipovi neutropenija koje uvijek treba razmotriti kao diferencijalne dijagnoze. Također, dijagnostika kongenitalnih neutropenija obuhvaća i postupke eliminacije stečenih uzroka neutropenija kao dio dijagnostičkog postupka. Posebno su istaknute metode genetskog testiranja i pregleda koštane srži budući da su to dijagnostički postupci specifični i nužni u obradi kongenitalnih neutropenija. Većina kongenitalnih neutropenija u pravilu se manifestira i dijagnosticira u dječjoj dobi. Stoga se u ovom preglednom radu obrađuju kao dijagnoza u domeni pedijatrijske hematologije koja često zahtijeva doživotno zbrinjavanje u domeni adultnog hematologa.

1.1. Neutrofili

Neutrofili su prve stanice imunološkog sustava koje sudjeluju u odgovoru na upalu ili infekciju. Nužni su za adekvatno funkcioniranje prirođenog i stečenog upalnog odgovora (1). Neutrofilni odgovor temelji se na fagocitozi, otpuštanju proteaza, antimikrobnih peptida i reaktivnih kisikovih radikala (2). Neutrofili igraju ključnu ulogu u eliminaciji patogena u ranim stadijima infekcije, ali također povezuju urođene i adaptivne imunološke odgovore za poticanje rezolucije upale i zacjeljivanja rana (1). Kod normalne odrasle osobe neutrofili žive u 3 okoliša: koštanoj srži, krvi i tkivima (3). U stacionarnim uvjetima, ukupan broj neutrofila u perifernoj krvi održava se ravnotežom između mijelopoetice u koštanoj srži, distribucije neutrofila između marginalnog bazena u mikrovaskulaturi i slobodno cirkulirajućeg bazena u krvi te brzine izlaska neutrofila iz krvi u tkiva (4). Cirkulirajući neutrofili čine svega 3-5 % ukupnog broja neutrofila (5). Koštana srž je mjesto diferencijacije hematopoetske matične stanice u neutrofilne progenitore te proliferacije i

završne maturacije neutrofilnih granulocita (iz mijeloblasta do segmentiranih neutrofila) (3). Proizvodnja u koštanoj srži regulirana je trima glavnim glikoproteinskim hormonima ili citokinima: IL-3, GM-CSF i G-CSF. Osim djelovanja na neutrofilne prekursore, G-CSF i GM-CSF djeluju direktno na neutrofile pospješujući njihovu funkciju. Reguliraju proizvodnju, preživljenje i funkcionalnu aktivnost neutrofila (4). Granulopoeza traje između 7 i 13 dana (5). Normalna humana produkcija neutrofila je od $0,85$ do $1,6 \times 10^9$ stanica/kg/dan. U nedostatku upalnog žarišta, napuštaju cirkulaciju nasumično s poluvremenom nestanka od približno 7h. Ovaj proces može biti ubrzan u prisustvu upale. Nakon toga odlaze u tkiva kako bi izvršili svoju glavnu funkciju obrane organizma prije smrti ili odlaska u gastrointestinalni trakt kroz mukoznu površinu (4). Istaknuta karakteristika neutrofila je otpuštanje citoplazmatskih granula. Primarne ili azurofilne granule pojavljuju se već u stadiju promijelocita, a sinteza sekundarnih ili specifičnih granula označava nastavak maturacije i progresiju u stadij neutrofilnog mijelocita. Zreli neutrofili imaju citoplazmatske i površinske strukture koje im omogućuju prihvaćanje i penetriranje kroz zidove venula. Neutrofili su transkripcijski aktivne stanice sposobne za rane i kasne promjene u ekspresiji gena, kao odgovor na poticaje različitih citokina i kemokina u njihovom mikrookolišu (3). Dokazano je da je *in vitro* antibakterijska aktivnost neutrofila usko vezana uz broj neutrofila te je odsutna kada taj broj padne ispod kritičnih vrijednosti (6).

1.2. Neutropenije

1.2.1. Definicija

Neutropenija se definira kao smanjenje apsolutnog broja neutrofila (ABN) ispod normalnih vrijednosti određenih za dob i etničku skupinu kojoj pacijent pripada. Za europsku novorođenčad i dojenčad do 1 godine starosti granična vrijednost ABN-a je $1,0 \times 10^9$ /L, a od 1 godine starosti do odraslog doba granična vrijednost je $1,5 \times 10^9$ /L. Za odrasle Europljane ABN manji od $1,8 \times 10^9$ /L smatra se neutropenijom. Za novorođenčad rođenu u terminu neutropenija se definira kao vrijednost ABN-a manja od $2,5 \times 10^9$ /L unutar prvih 72-240 sati nakon poroda, a za nedonoščad kao vrijednost ABN-a ispod $1,0 \times 10^9$ /L (7). Pojedine osobe afričkog ili srednjoistočnog porijekla pokazuju puno niže normalne

vrijednosti ABN-a koje se uglavnom kreću od $0,5$ do $1,5 \times 10^9/L$ (8–10). Za ovu varijaciju prije nazivanu etničkom neutropenijom, danas se koristi naziv ADAN (*engl. ACKR1/DARC-associated neutropenia*) zbog otkrivene genetske podloge povezane s nasljeđivanjem polimorfizma (rs2814778, -46T>C) u promotorskoj regiji gena koji kodira za atipični kemokinski receptor-1 (ACKR1 gen) (7).

1.2.2. Klasifikacija

Različiti su načini klasificiranja neutropenija. Obzirom na težinu, klasificiraju se prema vrijednostima ABN-a u perifernoj krvi na: **blagu neutropeniju** ako je vrijednost ABN-a između $1,0$ i $1,5 \times 10^9/L$, **umjerenu** za ABN od $0,5$ do $1,0 \times 10^9/L$ i **tešku** koja je definirana vrijednošću ABN-a manjom od $0,5 \times 10^9/L$. Agranulocitoza označava tešku neutropeniju s ABN-om manjim od $0,2 \times 10^9/L$ obično povezanu s visokim rizikom za razvoj teških po život opasnih infekcija. Obzirom na trajanje razlikujemo **akutnu** neutropeniju ako traje manje, odnosno **kroničnu** neutropeniju definiranu trajanjem duljim od 3 mjeseca (11,12). Neutropenije se s obzirom na uzrok mogu podijeliti na intrinzične i ekstrinzične. Intrinzične neutropenije nastaju zbog naslijeđenih ili stečenih abnormalnosti u hematopoetskoj progenitornoj stanici što rezultira nemogućnošću koštane srži da proizvede zrele neutrofile (npr. teška kongenitalna neutropenija, ciklička neutropenija). U ekstrinzične neutropenije ubrajaju se nutricionalne neutropenije nastale zbog deficita nekih tvari u prehrani (npr. vitamina B12, folne kiseline) i neutropenije nastale zbog različitih poremećaja imunološkog sustava (npr. autoimune neutropenije) (11). Prema novim smjernicama objavljenima 2023. godine (7), predlaže se korištenje i proširene klasifikacije na temelju patogeneze bolesti po kojoj se neutropenije kategoriziraju kao **kongenitalne, stečene i vjerojatno stečene** s odgovarajućim potkategorijama.

2. DIJAGNOSTIKA NEUTROPENIJA U DJECE

2.1. Osobna anamneza

U dijagnostici neutropenije i otkrivanju njezine etiologije iznimno je važno detaljno uzimanje anamneze s posebnim naglaskom na dosadašnje bolesti i obiteljsku anamnezu. Dob pri prvoj detekciji neutropenije je esencijalan dijagnostički podatak budući da je kongenitalna neutropenija najčešće dijagnosticirana u ranom djetinjstvu (7). Također, neutropenija u ranom djetinjstvu često je autoimuni poremećaj koji prolazi spontano unutar prve 3 do 4 godine života (13). Potrebno je pogledati prijašnje dostupne laboratorijske nalaze. Vrijednosti neutrofila zabilježene tijekom neke od prethodnih obrada mogu govoriti o trajanju neutropenije i pomažu razlikovati radi li se o akutnom ili kroničnom poremećaju koji traje duže vrijeme (11,14). Pri uzimanju anamneze pacijenta potrebno je saznati informacije o učestalosti, tipu i težini infekcija te eventualnim potrebama za hospitalizacijom. Iako su pacijenti s neutropenijom skloniji svim infekcijama, anamnestički je osobito važno pitanje postojanja ulceracija u ustima, rekurentnih faringitisa, otitisa, sinusitisa, omfalitisa, gingivitisa, parodontitisa, infekcija kože, apscesa, gastrointestinalnih simptoma, perianalnih infekcija i pneumonija (7,11,14,15). Periodičnost u pojavi rekurentnih infekcija govori u prilog cikličkoj neutropeniji (16,17). Prisustvo učestalih infekcija u ranoj životnoj dobi ključno je za postavljanje sumnje na dijagnozu teške kongenitalne neutropenije budući da se većini novorođenčadi ne radi kompletna krvna slika pri rođenju, a pronađena neutropenija se često pripisuje prematuritetu ili se smatra posljedicom imunoloških mehanizama (13).

Važno je pitati pacijenta ili njegove skrbnike ako se radi o malom djetetu, o postojanju ektrahematoloških simptoma koji bi govorili u prilog zahvaćenosti ostalih organskih sustava. Geni koji imaju ulogu u proizvodnji i sazrijevanju neutrofila, mogu imati važnu ulogu i u stanicama drugih sustava. Stoga će se i njihove mutacije očitovati različitim simptomima. Neke nehematološke manifestacije specifične su za određeni tip neutropenija što nas može usmjeriti prema daljnjim dijagnostičkim koracima (7). Za razmatranje mogućnosti sekundarnog uzroka neutropenije nužno je postaviti pitanja o

postojanju simptoma nekih drugih autoimunih bolesti, kroničnih virusnih infekcija uključujući virusne hepatitis i HIV, primjeni lijekova i suplemenata (14,18,19).

2.2. Obiteljska anamneza

Postojanje sniženih vrijednosti neutrofila u laboratorijskim nalazima ili sličnih simptoma kod članova obitelji djeteta koje obrađujemo govori u prilog genetskoj podlozi neutropenije. Ne smijemo zanemariti niti pripadnost pojedinim etničkim grupama s obzirom na prije spomenute varijacije u normalnom broju neutrofila svojstvene njima (8). Potrebno je isključiti pitanje kosangviniteta budući da se, kao što je Kostmann opisao 1956. godine (20), neke kongenitalne neutropenije s recesivnim naslijeđem češće pojavljuju u takvim zajednicama. Neobjašnjeni slučajevi spontanih pobačaja i novorođenačke smrti u obitelji mogu također biti povezani s kongenitalnim neutropenijama u podlozi (7). Moguće je postojanje potpuno uredne obiteljske anamneze kod pacijenta s kongenitalnom neutropenijom jer mnogi geni imaju varijabilnu penetraciju i fenotip bolesti može biti različit čak i unutar iste obitelji. Primjer je ELANE mutacija koja može uzrokovati dva entiteta: tešku kongenitalnu neutropeniju (TKN) i cikličku neutropeniju (CyN) kod različitih pojedinaca (21,22). Ako je neki član obitelji imao blaži ili čak umjereni tip neutropenije, postoji mogućnost da je ista bila zanemarena u nekom od prethodnih laboratorijskih nalaza (7). Negativna obiteljska anamneza moguća je i ako postoji parentalni mozaicizam, ako je uzrok bolesti *de novo* mutacija ili ako se neutropenija javlja kao dio bolesti s autosomno recesivnim naslijeđem (21). Podatak o smrti člana obitelji uzrokovanj infekcijom ili AML/MDS može biti od važnosti (7).

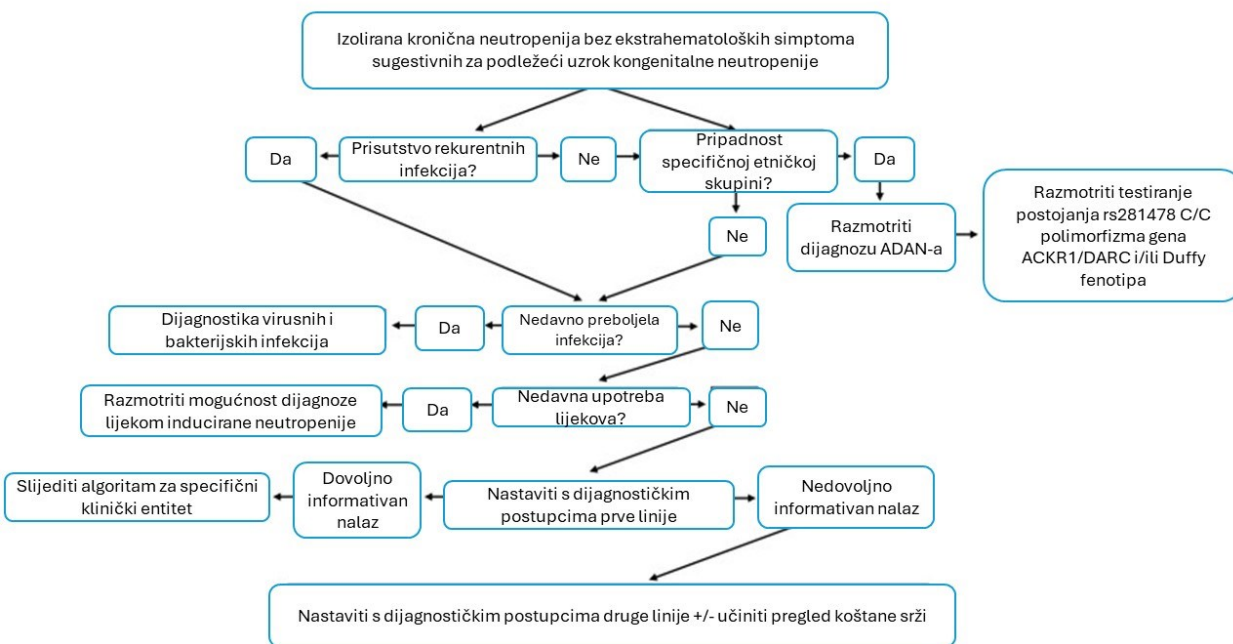
2.3. Klinički pregled

U kliničkom pregledu važno je tragati za znakovima aktivnih ili preboljelih infekcija s obzirom na to da neutropenični pacijenti zbog smanjenog upalnog odgovora mogu imati slabo izražene simptome infekcija. Potrebno je detaljno pregledati kožu i sluznice te posebnu pozornost obratiti na postojanje aftoznih ulceracija, abnormalnosti zuba i desni (znakovi kroničnog parodontitisa), na koži postojanje hiperpigmentacija, osipa, ulceracija, apscesa i izgled nokta. Kliničkim pregledom gornjeg i donjeg respiratornog trakta tražimo znakove akutnih ili kroničnih sinusitisa, faringitisa, otitisa, pneumonija i ostalih podležećih infekcija. Nužno je pregledati i limfne čvorove te isključiti postojanje hepatosplenomegalije budući da ti znakovi mogu govoriti o prisustvu limfoidnog ili mijeloidnog maligniteta, metaboličke bolesti ili ostalih bolesti u sklopu kojih se neutropenija može javiti kao sekundarni poremećaj. Pregledom abdomena tražimo znakove neutropeničnog kolitisa i abdominalne sepse, a perianalnu i perirektalnu regiju detaljno pregledavamo kako bi isključili nekrotizirajući celulitis uzrokovan bakterijama iz porodice *Clostridium* i ostalih anaeroba (7,11).

Osim za znakovima infekcija, kod neutropeničnih pacijenata nužno je tragati za znakovima kongenitalnih poremećaja i sindroma. Postojanje kongenitalnih malformacija kod pacijenta ili članova obitelji je važna informacija za genetski uzrok neutropenije budući da se mnogi oblici kongenitalnih neutropenija javljaju u sklopu različitih sindroma. Potrebno je ustanoviti postoji li zastoj u rastu i razvoju djeteta i je li praćen dismorfijama skeleta i/ili kognitivnim zaostajanjem. Ipak, odsustvo fenotipskih značajki ne isključuje podležeći kongenitalni poremećaj. Najčešći znakovi čijim pronalaskom možemo posumnjati na kongenitalni uzrok neutropenije su nizak rast, znakovi hondrodisplazije, skeletnih, srčanih i urogenitalnih abnormalnosti, pojačana vidljivost površinskih vena, miopatija, abnormalnosti kose, noktiju ili kože, postojanje fotofobije, nistagmusa, okulokutanog albinizma i mnoge druge (7,23).

2.4. Dijagnostički postupci

U novim smjernicama za dijagnostiku i zbrinjavanje neutropenija kod odraslih i djece iz 2023. godine (7), objavljen je algoritam dijagnostičkih postupaka za pacijente s kroničnom izoliranom neutropenijom (Slika 1). Pacijenti s akutnom neutropenijom i znakovima infekcije, ovisno o težini infekcije i same neutropenije mogu zahtijevati hitnu obradu, a ponekad i hospitalizaciju. Ostali bi se trebali obrađivati prema dijagnostičkom algoritmu za neutropenije odnosno dostupnosti dijagnostičkih pretraga i alata. Ako se isključi mogućnost postojanja neutropenije uzrokovane lijekom, postinfektivne neutropenije ili ACKR1/DARC-vezane neutropenije (ADAN) za koju se prije koristio naziv benigna etnička neutropenija, pristupa se prvoj liniji dijagnostičkih pretraga. Ako su rezultati pretraga koji pripadaju prvoj liniji nejasni ili ne daju dovoljno informacija, pristupa se dijagnostičkim postupcima druge linije (7).



Slika 1. Algoritam dijagnostičkih postupaka za pacijente s kroničnom izoliranom neutropenijom. Modificirano prema (7).

Dijagnostički postupci prve linije

Iako kliničkim pregledom i detaljno uzetom anamnezom možemo ponekad usmjeriti dijagnostičku obradu prema određenoj skupini neutropenija, te informacije nisu uvijek dostatne. Stoga je pri dijagnostici neutropenija potreban velik broj pretraga kojima je primarno razlučiti radi li se o kongenitalnom ili stečenom tipu neutropenije. U prvoj liniji dijagnostičkih pretraga za kronične izolirane neutropeniju radi se kompletna krvna slika i razmaz periferne krvi (7). Prvi korak je potvrda perzistentne neutropenije ponavljanjem nalaza krvi unutar 7 dana ili 3 mjeseca nakon prvog nalaza ovisno o broju neutrofila i kliničkom tijeku bolesti pojedinog pacijenta (23). Ako su uzorci krvi uzeti tijekom aktivne akutne infekcije, vrijednost apsolutnog broja neutrofila često ne mora biti mjerodavna. Zbog stresa uzrokovanog upalnim odgovorom može doći do pojačanog mobiliziranja neutrofila iz koštane srži, ali i do iscrpljenja njihovih rezervi. Stoga vrijednost ABN-a u takvim stanjima može biti i viša i niža od realnih vrijednosti (13). Obrada bi trebala biti ubrzana kod pacijenata koji se prezentiraju teškom bolešću ili njihova bolest pokazuje progresivan obrazac (23). Postojanje neutropenije zajedno s poremećajem broja još neke skupine stanica, može nas usmjeriti pri otkrivanju etiologije nastanka neutropenije. Neutropenija kombinirana s anemijom i/ili trombocitopenijom sugerira na moguće postojanje autoimune bolesti, infekcije ili zatajenja koštane srži. Neutropeniju i trombocitopeniju zajedno možemo vidjeti kod hipersplenizma. Neutropenija i limfocitopenija mogu govoriti u prilog idiopatskoj neutropeniji ili autoimunoj bolesti kao etiološkoj pozadini, a ako se radi o teškoj neutropeniji s limfocitopenijom trebali bi razmotriti dijagnozu WHIM sindroma (*engl. Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis syndrome*) (14). Od biokemijskih pretraga važne su vrijednosti parametara koji govore o jetrenoj i bubrežnoj funkciji, vrijednosti CRP-a, imunoglobulina, vitamina B12 i folata te drugih vitamina (7). Manjak transkobalamina koji djeluje kao nosač vitamina B12 opisan je kao jako rijedak uzrok neutropenije (14). Određuje se postojanje protutijela na najčešće virusne uzročnike koji mogu uzrokovati neutropeniju, a oni uključuju HepB, HepC, HIV, EBV, CMV i Parvovirus. U primarne dijagnostičke pretrage spada i određivanje indirektnih antineutrofilnih protutijela, vrijednosti hormona štitnjače (FT3, FT4, TSH) kao i antitireoidnih protutijela (anti-TG i anti-TPO) (7). Pozitivan test za postojanje antineutrofilnih protutijela osim kod

pacijenata s autoimunom neutropenijom, može postojati i kod onih s kongenitalnim uzrokom neutropenije (14,24). Potrebno je napraviti i protočnu citometriju limfocita periferne krvi, a kao dodatna pretraga kod djece radi se i analiza TCR- α/β pozitivnih dvostruko negativnih (CD4- i CD8-) CD3 limfocita periferne krvi (7). Protočna citometrija radi se u svrhu identifikacije postojanja akutne leukemije, paroksizmalne noćne hemoglobinurije ili leukemije velikih granularnih limfocita (25).

Dijagnostički postupci druge linije

Kad dijagnostički postupci prve linije nisu dovoljni da se pronađe uzrok neutropenije pristupa se dijagnostičkim postupcima druge linije. Njima pripada određivanje vrijednosti neutrofila dvaput tjedno tijekom perioda od 6 tjedana kako bi se isključila ciklička neutropenija (7). U cikličkoj neutropeniji mogu postojati i recipročne cikličke oscilacije ostalih stanica. Taj obrazac često pokazuju monociti, ali ponekad i retikulociti, limfociti, trombociti i eozinofili (11). Može se odrediti i kompletna krvna slika članova obitelji, vrijednosti bakra i ceruloplazmina u krvi, anti-tTG-IgA protutijela, deaminirana glijadinska protutijela IgA/IgG i pankreatične amilaze. Kod djece se dodatno određuju i vrijednosti RF, ANA, ENA i ds-DNA protutijela (7). Postojanje nekih od navedenih protutijela pomaže nam pri identifikaciji pacijenata s autoimunom bolešću (14). Stručnjaci koji su sudjelovali u sastavljanju novih smjernica za dijagnostiku i liječenje neutropenija iz 2023.godine preporučuju da se genetsko testiranje učini već nakon provedenih dijagnostičkih postupaka prve linije ukoliko se radi o malom djetetu s pozitivnom obiteljskom anamnezom teške neutropenije, djetetu u čijoj se dosadašnjoj anamnezi ističu teške rekurentne infekcije ili djetetu s karakterističnim kongenitalnim anomalijama. Kod ostale se djece također preporuča učiniti genetsko testiranje kako bi se isključila kongenitalna neutropenija ukoliko rezultati pretraga druge linije nisu jasni (7).

Pregled koštane srži

Aspiracija i biopsija koštane srži dijagnostičke su metode koje daju informacije o celularnosti, broju i zrelosti megakariocita, eritroidnih i mijeloidnih prekursora te prisustvu

znakova displazije (7). Ako se neutropenija pojavljuje zajedno sa sniženim brojem još nekog tipa stanica bilo da se radi o anemiji, trombocitopeniji ili limfopeniji, pregled koštane srži je koristan za isključenje postojanja sindroma zatajenja koštane srži, mijelodisplastičnog sindroma ili leukemije (23). Pregled koštane srži koji uključuje morfologiju stanica, citogenetiku i sekvenciranje gena povezanih s mijeloidnim novotvoreninama trebao bi biti učinjen kod svih pedijatrijskih pacijenata s teškom ili umjereno teškom kroničnom neutropenijom osim onih s dokazanom primarnom autoimunom neutropenijom s pozitivnim antineutrofilnim protutijelima te neutropenijom izazvanom djelovanjem lijeka (7). Kako bi dobili što reprezentativnije rezultate uputno je ovu pretragu raditi kad se pacijent nalazi u dovoljno stabilnom stanju, odnosno nakon zbrinjavanja akutne infekcije (13). Dijagnostička pretraga koštane srži kod mnogih pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom pokazuje zastoj u sazrijevanju neutrofilnih prekursora rano u stadiju promijelocita ili mijelocita. Sukladno tome vidljiv je blago povišen broj promijelocita uz uglavnom urednu ili blago sniženu celularnost i često eozinofiliju i monocitozu unutar koštane srži (5,7,26). Morfologija mijeloidnih stanica u većini slučajeva nije indikativna za pronalazak točnog uzroka kongenitalne neutropenije (13). Ipak, citološki pregled ponekad može otkriti morfološke karakteristike koje govore u prilog pojedinim uzrocima neutropenije (26). Pacijenti s mijelokateksijom koja je dio WHIM sindroma mogu imati mnoštvo zrelih neutrofila u koštanoj srži. To odgovara patogenezi bolesti u kojoj neutrofilni otežano izlaze iz koštane srži u perifernu krv (5,11,26). Kondenzirani kromatin i hiposegmentirani neutrofilni mogu se vidjeti kod Shwachman-Diamond sindroma, a abnormalne citoplazmatske granulacije sugeriraju na postojanje Chediak Higashi sindroma (5,26). Celularnost koštane srži kod pacijenata s dijagnozom cikličke neutropenije ovisi o dijelu ciklusa u kojem je uzorak uzet. Ako se uzorak uzme neposredno prije faze oporavka razine neutrofila u perifernoj krvi, u koštanoj srži se može uočiti nakupljanje zrelih neutrofila i proliferativni odgovor (11). Procjena rezervi zrelih neutrofila unutar koštane srži i marginaliziranih odjeljaka krvnih žila mogu imati važnost u određivanju potencijalnog porasta apsolutnog broja neutrofila u slučaju infekcije. Za to su se prije koristili glukokortikoidi, a danas su uglavnom zamijenjeni G-CSF stimulacijskim testom za kojeg je dokazano da djeluje mehanizmom sličnim kao i steroidi (23). Citogenetski testovi korisni su za isključenje stečenih kromosomskih abnormalnosti

tipičnih za MDS/AML (11). Uzorci koštane srži mogu se također koristiti za genetsko testiranje na stečene somatske mutacije u genima kao što su RUNX-1, CSF3R i TP53. To su geni koji sudjeluju u leukemogenezi za koju dokazano postoji povećan rizik u kongenitalnim neutropenijama (7,27,28). Ako se ne učini u sklopu dijagnostičke obrade neutropenije, pregled koštane srži potrebno je učiniti prije započinjanja terapije G-CSF-om kako bi se isključilo postojanje MDS/AML i nadzirao rizik od maligne transformacije. Preporučuje se jednom godišnje učiniti pregled koštane srži kod pacijenata s kongenitalnom neutropenijom, a isto razmotriti i kod pacijenata s idiopatskom neutropenijom koja nije jasno identificirana kao kongenitalna, ali zahtijeva terapiju G-CSF-om (7).

Genetsko testiranje

Genetsko testiranje ima ključnu ulogu u potvrdi dijagnoze kongenitalne neutropenije kod djece i procjeni rizika za kasne komplikacije koje uključuju malignu transformaciju u MDS/AML. Osim toga služi i u selekciji donora koštane srži pacijentima kandidatima za transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica i genetsko savjetovanje članova obitelji pacijenata s dijagnosticiranom kongenitalnom neutropenijom (7). Sve raširenije i dostupnije genetsko testiranje u evaluaciji neutropenija donijelo je znatan napredak u dijagnostici i objašnjavanju etiološke pozadine pojedinih kongenitalnih neutropenija, ali i mnogo novih izazova (21). Identifikacija sve više novih genetskih uzroka kongenitalnih neutropenija znatno je unaprijedila dosadašnje razumijevanje neutrofilne biologije i funkcije. To ujedno čini osnovu za razvoj novih ciljanih terapija koje bi mogle biti primjenjive u liječenju specifičnih podvrsta kongenitalnih neutropenija (21,29). Preporuka je prije genetskog testiranja ponuditi pacijentima i njihovim obiteljima genetsko savjetovanje. Ono je korisno kako bi se moglo objasniti koje su indikacije, prednosti, ograničenja i vrijeme čekanja rezultata genetskog testiranja te koji utjecaj rezultati genetskog testiranja imaju na daljnji klinički tijek njihove bolesti i odabir terapije. Za genetsko testiranje DNA se uglavnom izolira iz uzoraka krvi. Međutim, hematopoetske stanice mogu imati stečene somatske mutacije. Kako bi sa sigurnošću razlikovali somatske od mutacija zametne linije potrebno je testirati nehematopoetsko tkivo. Za to

se najčešće koriste kožni fibroblasti, a u istraživačkim laboratorijima ponekad i folikuli dlaka te nokti (21). Mutacije nekih gena (npr. RUNX1, GATA2 i CSF3R) mogu postojati kao somatske mutacije u malignitetima kao što su MDS, AML i limfomi, ali i kao mutacije zametne linije koje su poznati uzroci kongenitalnih neutropenija. Zbog takvog preklapanja važno je odabrati ispravan panel genetskih testova za traženu vrstu mutacija (21,30). Stečene somatske mutacije potencijalno uključene u leukemičnu transformaciju u sklopu kongenitalnih neutropenija mogu se detektirati somatskim panelom sekvenciranja. Stanice koštane srži i periferne krvi smatraju se jednako važnim izvorima za detekciju somatskih mutacija osim u stanjima teške neutropenije ili monocitopenije (7,31). Za RNA-sekvenciranje, RNA se ekstrahira iz mijeloidnih stanica iz koštane srži ili periferne krvi, a preferiraju se promijelociti iz koštane srži ili neutrofilni iz periferne krvi (7). Analiza mutacija unutar jednog gena metodom Sangerovog sekvenciranja u dijagnostici kongenitalnih neutropenija može se raditi kad postoji visoka klinička sumnja potkrijepljena postojanjem karakterističnog fenotipa za mutaciju nekog specifičnog gena. Osim toga koristi se i za probir članova obitelji nositelja mutacije djeteta koje ima potvrđenu određenu genetsku mutaciju (21). Budući da je mutiran kod otprilike 45 % pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom, Sangerovo sekvenciranje gena ELANE preporučuje se kao prvi korak u genetskoj dijagnostici tipičnih slučajeva (7,13,26). Ako to sugerira klinička slika ili postojeća pozitivna obiteljska anamneza, opravdano je sekvencirati i neki drugi gen povezan s kongenitalnom neutropenijom. Na primjer, ako je uz neutropeniju prisutna kardiomiopatija, uputno bi bilo sekvencionirati TAZ gen čija mutacija uzrokuje Barthov sindrom, a postoje li uz neutropeniju srčane i genitourinarne malformacije sekvenciranje gena G6PC3 može biti korisno. Slabiji rast, malapsorpcija, masne stolice i koštane malformacije indikacija su za testiranje SBDS gena mutiranog kod većine pacijenata sa Shwachman-Diamond sindromom (SDS) (7,14). Problem je što pacijent s naizgled prepoznatljivim fenotipom može imati mutacije u jednom od nekoliko potencijalnih gena. Kao primjer su uzeti pacijenti s okulokutanom albinizmom i neutropenijom koji mogu imati mutacije u genima LYST, AP3B1, RAB27A ili LAMTOR2 (21). Uzimajući u obzir široku varijabilnost i preklapanja u kliničkim fenotipovima različitih mutacija, veća isplativost i efikasnost se uglavnom postiže koristeći višestruku ciljanu analizu više gena povezanih s kongenitalnim neutropenijama (26). Zasad je poznato više od 30 gena mutiranih u

kongenitalnim neutropenijama. Važno je da se pri ciljanom sekvenciranju obuhvate i geni mutirani u bolestima kao što su imunodeficijencije, metaboličke bolesti, sindromi zatajenja koštane srži i druge bolesti u kojima se kongenitalna neutropenija javlja kao sekundarni poremećaj (7). Pacijenti s neidentificiranim genetskim uzrokom nakon provedenih prije navedenih metoda mogu biti podvrgnuti metodama sekvenciranja cijelog egzoma (WES) ili sekvenciranja cijelog genoma (WGS). Cijeloegzomskim sekvenciranjem (WES) mogu se identificirati mutacije u RNA genima kodirajućim za proteine kao i onim nekodirajućim. To je omogućilo pronalazak dotad nepoznatih mutacija poboljšavajući tako razumijevanje patogeneze sve većeg broja kongenitalnih neutropenija. Ipak, nužno je naglasiti da neke regije genoma ostaju nepokrivene i ovom metodom genetske analize (21). Ako postoji sumnja na kongenitalnu neutropeniju, a svi dotad provedeni genetski testovi su negativni, treba razmotriti sekvenciranje cijelog genoma (WGS) ili RNA-sekvenciranje kao idući korak (7). Cijelogenomsko sekvenciranje (WGS) omogućuje analizu neegzonskih dijelova gena i nekodirajućih varijanti kao što su duboke intronske mutacije (*engl. deep intronic mutations*) i mutacije u promotorskoj i pojačivačkoj regiji koje nisu pokrivene cijeloegzomskim sekvenciranjem (WES). Nedostatak ovakve analize je što se povećanjem širine obuhvaćenih mutacija smanjuje temeljitost, a bioinformatička analiza i klinička interpretacija ovako velike baze podataka predstavlja vremenski i financijski izazov. Ipak, povećanjem temeljitosti analize i razvojem novih post-sekvencijskih analitičkih alata, očekuje se da će WES i WGS postati šire dostupne metode genetske analize sve češće primjenjivane i izvan istraživačkih laboratorija (21). Genetsko testiranje se može koristiti i za identifikaciju polimorfizma rs2814778 u genu ACKR1/DARC kod pacijenata određenih etničkih pripadnosti koji se prezentiraju blagom do umjerenom neutropenijom bez povećane sklonosti infekcijama. Na taj način bi se potvrdila prije spomenuta dijagnoza ADAN (*engl. ACKR1/DARC-associated neutropenia*) poznata pod starim nazivom benigna etnička neutropenija i izbjegla daljnja iscrpna dijagnostička obrada (8,32). Budući da postoji studija koja pokazuje povećanu učestalost ovog polimorfizma kod kohorte europskih pacijenata s kroničnom idiopatskom neutropenijom, njegova identifikacija bi se mogla uključiti u dijagnostiku svih pacijenata sa slikom blage kronične neutropenije (33).

3. STEČENE NEUTROPENIJE

Stečene neutropenije mogu se podijeliti na **primarne** (idiopatske) i **sekundarne**. Primarne stečene neutropenije karakterizira postojanje antineutrofilnih protutijela ili su uzrokovane nekih drugim nepoznatim mehanizmom (7). **Primarna autoimuna neutropenija** (AIN) pojavljuje se u ranom djetinjstvu, uglavnom prije treće godine života i karakterizira je vrlo visok stupanj spontane rezolucije unutar 24-36 mjeseci od početka (34). Ako se protutijela ne mogu detektirati, postavlja se dijagnoza idiopatske neutropenije (IN). Autoimuna (AIN) i idiopatska neutropenija (IN) najčešći su uzroci kronične neutropenije u mlađoj dječjoj dobi (15). Stečene neutropenije u dječjoj dobi bilo da su definirane kao autoimuna (AIN) ili idiopatska (IN), manifestiraju se blažim fenotipom od kongenitalnih formi (23). Sekundarne stečene neutropenije nastaju sekundarno kao posljedica infekcija, autoimunih bolesti, izloženosti određenim lijekovima, nutritivnim deficitima ili pak u sklopu hipersplenizma ili neke hematološke bolesti (7,18,35–37). Postinfektivna neutropenija se uglavnom prezentira kao blaga do umjerena neutropenija koja ima tendenciju prolaska unutar 4 do 6 tjedana nakon infekcije (23). Uzroke stečenih anemija možemo podijeliti na kronične i prolazne. Najčešći uzroci kroničnih stečenih neutropenija su aplastična anemija, nedostatak vitamina B12 i folata, infekcija HIV-om, mijelodisplastični sindrom te autoimuna neutropenija koja može ili ne mora biti povezana s ostalim autoimunim poremećajima. Najčešći uzroci prolaznih stečenih neutropenija su primjena kemoterapije, radioterapije, uzimanje kortikosteroida, virusne infekcije, trovanje teškim metalima i cijepljenje (38).

4. VJEROJATNO STEČENE NEUTROPENIJE

Grupa vjerojatno stečenih neutropenija odnosi se na idiopatsku ili autoimunu neutropeniju dječje dobi koja ima benigni početak i nekompliciran tijek, ali se od primarne autoimune neutropenije razlikuje po tom što ne prolazi nakon 24-36 mjeseci ili pak ima kasni početak (nakon 3. godine života). Genetske analize pokazale su postojanje patogenih varijanti unutar gena povezanih s imunodeficijencijama i drugim poremećajima imunološkog sustava u pojedinim slučajevima, a dio pacijenata imao je limfopeniju sa sniženim B limfocitima i sniženim NK stanicama. Također su se od primarne autoimune neutropenije razlikovale po težini neutropenije, učestalosti pridruženih autoimunih bolesti i dozi potrebnog G-CSF-a za liječenje (7,34). Stoga je ova skupina neutropenija, koja uključuje autoimunu neutropeniju dugog trajanja (LL-Np) i onu s kasnim početkom (LO-Np), iako primarno smatrana dijelom stečenih neutropenija, izdvojena zbog potrebe za detaljnim isključivanjem podležećeg genetskog uzroka (7).

5. KONGENITALNE NEUTROPENIJE (KN)

5.1. Definicija

Kongenitalne neutropenije čine grupu rijetkih genetskih bolesti karakteriziranih poremećajem u proizvodnji, diferencijaciji i preživljenju neutrofila u koštanoj srži, sklonošću infekcijama i povećanom vjerojatnošću za MDS/AML transformaciju (7). Radi se o heterogenoj skupini bolesti uzrokovanih mutacijama u genima koji kodiraju za proteine uključene u sazrijevanje, promet i homeostazu mijeloidne loze, a nasljeđuju se kao X-vezane, autosomno dominante ili autosomno recesivne (23,38). U literaturi se pojam „kongenitalna neutropenija“ ne koristi jednoznačno. U nekim radovima taj pojam obuhvaća isključivo oblike kongenitalnih neutropenija koje nisu povezane s drugim imunološkim ili ekstrahematološkim abnormalnostima, dok u drugim obuhvaća sve entitete koji uz kroničnu neutropeniju mogu imati i poremećaje u različitim sustavima. U ovom radu pojam „kongenitalne neutropenije“ nije ograničen isključivo na poremećaje u kojem je neutropenija jedina fenotipska manifestacija, već na sve kongenitalne poremećaje koji imaju neutropeniju kao dio kliničke slike. Teška kongenitalna neutropenija (TKN) označava grupu rijetkih genetski heterogenih nasljednih poremećaja hematopoeze karakteriziranih zastojem u neutrofilnoj diferencijaciji u koštanoj srži koji rezultira apsolutnim brojem neutrofila u perifernoj krvi (ABN) manjim od $0,5 \times 10^9 /L$ (13,39). Kod većine dolazi do zastoja maturacije u stadiju promijelocita što se uz neutropeniju, očituje povećanim brojem atipičnih promijelocita (13,40). Broj monocita je u teškoj kongenitalnoj neutropeniji povišen što ukazuje na recipročnu vezu između proizvodnje ovih dvaju tipova stanica, a moguće je vidjeti i hipereozinofiliju i hipergamaglobulinemiju (5). Pacijenti s teškom kongenitalnom neutropenijom imaju povećan rizik za razvoj po život opasnih infekcija i povećan rizik za progresiju u mijelodisplastični sindrom ili akutnu leukemiju, obično mijeloidnog tipa (23,41). Povećan rizik za malignu transformaciju objašnjava se postojanjem podležeće genetske nestabilnosti kao zajedničke karakteristike svih tipova kongenitalnih neutropenija (40). Dokazano je da u većine pacijenata malignoj transformaciji prethode molekularne promjene koje uključuju stečene mutacije pojedinih gena uključenih u proces leukemogeneze. Najčešći uzrok kongenitalnih neutropenija je autosomno dominantna

mutacija gena ELANE koji kodira za enzim neutrofilnu elastazu te mutacija u genu HAX1 čiji proteinski produkt pridonosi aktivaciji G-CSF signalnog puta, a nasljeđuje se autosomno recesivno (13). Sve širom primjenom novih molekularnih metoda i “metode sekvenciranja sljedeće generacije” (*engl. Next Generation Sequencing*) u dijagnostici neutropenija, i dalje raste broj identificiranih gena uzročno povezanih s razvojem kongenitalnih neutropenija. Ipak, postoji i velik broj pacijenata s još nedefiniranim genetskim uzrokom (38,39,42). To se objašnjava pretpostavkom da neke od njih ne nastaju na monogenetskoj osnovi što je bilo prihvaćeno stajalište tijekom niza godina, već kao posljedica djelovanja nekoliko gena (38,43). Najnoviji identificirani genetski uzroci nastanka kongenitalnih neutropenija su mutacija u genu CLPB (kodira za protein koji sudjeluje u regulaciji funkcije mitohondrija), SEC61A1 (kodira za protein uključen u homeostazu kalcija i transport proteina u ER) te SRP54 (kodira za protein koji je dio ribonukleoproteinskog kompleksa uključenog u translokaciju polipeptida na površinu ER) (39,44,45).

5.2. Epidemiologija

Teške kongenitalne neutropenije su rijetka stanja s procijenjenom prevalencijom od 3-8.5 slučajeva na milijun pojedinaca. Čini se da su mutacije koje se nasljeđuju autosomno dominantno češći uzroci dok se autosomno recesivne mutacije uglavnom dijagnosticiraju pri postojanja konsangviniteta u obitelji. Demografska obilježja igraju važnu ulogu u prevalenciji pojedinih mutacija u različitim dijelovima svijeta (13). Za razliku od Sjedinjenih Američkih Država, prevalencija HAX1 mutacije kao uzroka teške kongenitalne neutropenije je u Europi visoka (11 % teških kongenitalnih neutropenija) što se uglavnom povezuje s postojanjem velikog broja konsangvinih obitelji turskog i arapskog porijekla. U Izraelu je uočena velika prevalencija mutacija u genu G6PC3 od čak 25 % (13,46).

5.3. Klasifikacija

Nadopunjavanjem saznanja o molekularnoj pozadini pojedinih formi kongenitalnih neutropenija, klasifikacije kongenitalnih neutropenija mijenjale su se tijekom godina (5). Sve do kasnih 1990-ih literatura je razlikovala cikličku neutropeniju povezanu s tipičnim obrascem promjene u broju neutrofila i autosomno dominantnim naslijeđem od permanentne neutropenije koja se smatrala sinonimom za tešku kongenitalnu neutropeniju ili Kostmannov sindrom (5,47). Identifikacija mutacija ELANE gena za neutrofilnu elastazu 1999. godine kod pacijenata s cikličkom neutropenijom i ubrzo nakon toga pronalazak mutacije istog gena kod mnoštva pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom, bili su ključni za svrstavanje cikličke neutropenije u skupinu kongenitalnih neutropenija (48,49). Kongenitalne neutropenije mogu se klasificirati s obzirom na mutirane gene identificirane kao odgovorne za podtipove ovih poremećaja (Tablica 1) (7). Subklasifikacija se može raditi i ovisno o tom radi li se o izoliranoj neutropeniji ili je ona povezana s mutacijama gena koji se osim kongenitalnom neutropenijom očituju poremećajima imunološkog sustava (npr. mutacije STK4, CXCR4, ADA2, LYST), metaboličkim poremećajima (npr. mutacije SLC37A4/G6PT1, TCN2), različitim ekstrahematološkim manifestacijama (npr. mutacije TAZ, G6PC3, GF1, HAX, JAGN1, TCIRG1) ili se pojavljuju kao dio sindroma zatajenja koštane srži (npr. mutacije SBDS, SRP54, GATA1) (7,23). U skupinu izoliranih kongenitalnih neutropenija ubrajaju se ciklička neutropenija i teške kongenitalne neutropenije uzrokovane mutacijama u genima ELANE, CSF3R, CXCR2 i WAS koje se ne očituju nikakvim ekstrahematološkim simptomima (7).

Tablica 1. Klasifikacija kongenitalnih neutropenija. Modificirano prema (7).

Klasifikacija kongenitalnih neutropenija			
Kongenitalne neutropenije	Uključeni geni	Tip nasljeđivanja	Glavne značajke/napomene
Izolirane			
Teška kongenitalna neutropenija	ELANE	AD	Zaustavljanje sazrijevanja neutrofila u koštanoj srži
	CSF3R	AD	Zaustavljanje sazrijevanja neutrofila u koštanoj srži, ne odgovora na G-CSF
	CXCR2	AR	Nema zaustavljanja sazrijevanja i mijelokateksije
	WAS	X-vezano	Zaustavljanje sazrijevanja, monocitopenija, limfopenija
Ciklička neutropenija	ELANE	AD	Povremeno/ciklički narušena diferencijacija
Povezane s različitim ekstrahematološkim manifestacijama			
Barthov sindrom	TAZ	X-vezano	Nema zaustavljanja sazrijevanja, hipertrofična kardiomiopatija, miopatski sindrom
Charcot-Marie-Tooth neuropatija tip B	DNM2	AD	Slabost i atrofija mišića distalnih ekstremiteta zbog periferne neuropatije
Cohenov sindrom	VPS13B	AR	Nema zaustavljanja sazrijevanja, psihomotorni

			poremećaji, mikrocefalija, specifična obilježja lica, hipotonija, labavost zglobova, progresivna retino-koroidalna distrofija, miopija
G6PC3 mutacija	G6PC3	AR	Hiperelastičnost kože i izražen površinski venski crtež, kongenitalna srčana bolest, aritmije, uropatija, kriporhizam, egzokrina disfunkcija gušterače
GFI1 mutacija	GFI1	AD	Ponekad zaustavljanje sazrijevanja, limfopenija, povećan broj nezrelih mijeloidnih stanica u perifernoj krvi, defekt unutarnjeg uha
HYOU1 deficijencija	HYOU1	AR	Hipoglikemija i upalne komplikacije
JAGN1 mutacija	JAGN1	AR	Ponekad zaustavljanje sazrijevanja, abnormalnosti kostiju i zuba, egzokrina disfunkcija gušterače
Kostmannova bolest	HAX1	AR	Zaustavljanje sazrijevanja, mentalna retardacija, napadaji, sklonost razvoju MDS/AML
P14/LAMTOR2 mutacija	LAMTOR2	AR	Nema zaustavljanja sazrijevanja, kronična neutropenija, hipogamaglobulinemija, okulokutani albinizam, nenapredovanje

Pearsonov sindrom	Delecije mitohondrijske DNA	Mitohondrijsko nasljeđivanje	Refraktorna sideroblastična anemija, vakuolizacija prekursora koštane srži, egzokrina disfunkcija gušterače
Schimkeova imuno-koštana displazija	SMARCAL1	AR	Spondilo-epifizna displazija, sporo progresivni imunološki defekt, nefritis uzrokovan imunokompleksima
SEC61A1 mutacija	SEC61A1	AD	Zaustavljanje sazrijevanja, tubulointersticijska bubrežna bolest
SMARCD2 mutacija	SMARCD2	AR	Displastični sindrom, nema granula u neutrofilima, kronični proljev, abnormalnosti kostiju, spuštene uši
Specifični nedostatak granula	CEBPE	AR	Neutrofili s bilobiranim jezgrama
TCIRG1 neutropenija	TCIRG1	AD	Varijabilno/nema zaustavljanja sazrijevanja, angiomatoza kože
VPS45 mutacija	VPS45	AR	Mijeloidna hiperplazija, mijelofibroza, nefromegalija, HSM, mentalna retardacija, epilepsija, osteoskleroza
Wolcott-Rallisonov sindrom	EIF2AK	AR	Zaustavljanje sazrijevanja, inzulin-ovisni neonatalni dijabetes, epifizna displazija, zaostajanje u rastu, disfunkcija jetre i bubrega, zaostajanje u

			psihomotornom razvoju, egzokrina disfunkcija gušterače
Povezane s imunodeficijencijom / disregulacijom imunološkog sustava			
Nedostatak adenozin deaminaze 2	ADA2	AR	Teška kombinirana imunodeficijencija, vaskulitis, cerebrovaskularna bolest, aplazija eritrocita, ZKS
ALPS	FAS, FASLG, CASP10	AD	Limfoproliferacija i autoimune citopenije
CD40L/hiper IgM sindrom, tip I	CD40L	X-vezano	Teške infekcije, autoimune bolesti, predispozicija za rak
Chédiak-Higashi sindrom	LYST	AR	Smanjena pigmentacija kose i očiju, peroksidaza-pozitivna inkluzijska tjelešca u mijeloblastima i promijelocitima koštane srži, razvoj limfoma
CLPB sindrom	CLPB	AR	Katarakte i neurološki simptomi
FHLH	PRF1, nedostatak perforina (FHL2)	AR	Groznica, HSM i citopenije
	UNC13D, UNC13D deficijencija (FHL3)	AR	Groznica, HSM i citopenije
GATA2 sindrom	GATA2	AD	Monocitopenija, gluhoća, HPV infekcije
Griscelli sindrom, tip II	RAB27A	AR	Hipomelanoza, neurološko oštećenje
Hermansky-Pudlak sindrom tip 2	AP3B1	AR	Albinizam

Retikularna disgeneza	AK2	AR	Teška kombinirana imunodeficijencija i senzorneuralna gluhoća
STK4 mutacija	STK4	AR	Intermitentna neutropenija, monocitopenija, T- i B-limfopenija, atrijski defekt, HPV infekcije
WHIM sindrom	CXCR4	AD	Nema zaustavljanja sazrijevanja, mijelokateksija i limfopenija, kardiopatija (tetralogija Fallot)
Wiskott-Aldrichov sindrom	WAS dobitak funkcije	X-vezano	Ekcem, trombocitopenija, teške infekcije, krvavi proljev
CVID	Različiti geni uključujući TNFSRF13, BAFFR, CTL4, LRBA, PI3K	AD, AR	Ponavljajuće infekcije, hipogamaglobulinemija, autoimune citopenije (uključujući neutropeniju)
Povezane s metaboličkim poremećajima i nutritivnim deficijencijama			
Gaucherova bolest tip I	GBA	AR	HSM, trombocitopenija, osteolitičke lezije
Glikogenoza tip Ib	SLC37A4/G6PT1	AR	Hepatomegalija, IBD, hipoglikemija
Izovalerična acidemija	IVD	AR	Neonatalna ketoacidoza, kašnjenje u razvoju, letargija, odbijanje hrane
Metilmalonska acidemija	MMUT	AR	Letargija, nenapredovanje, ponavljajuće povraćanje, hipotonija, hepatomegalija, zaostajanje u psihomotornom razvoju

Propionska acidemija	PCCB, PCCA	AR	Letargija, kardiomiopatija, poteškoće s hranjenjem, akutna encefalopatija
Manjak transkobalamina II	TCN2	AR	Usporen psihomotorni razvoj, proljev, povraćanje, letargija, ulceracije sluznice
Povezane sa zatajenjem koštane srži			
Fanconijeva anemija	FANC komplementacijska skupina	AR X-vezano (FANCB)	Kongenitalne malformacije i predispozicija za rak
Diamond-Blackfan anemija	RPS7, RPS10, RPS15, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS27a, RPS28, RPS29 RPL5, RPL9, RPL11, RPL15, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35a	AD	Eritroidna hipoplazija, kongenitalne malformacije, zaostajanje u rastu, osteosarkom, MDS i AML
	GATA1	X-vezano	Rana pojava anemije, trombocitopenija, eritroidna hipoplazija koštane srži
	EPO	AR	Eritroidna hipoplazija
	TSR2, HEATR3	X-vezano AR	Eritroidna hipoplazija, kraniofacijalni defekti, nizak rast, specifična obilježja lica, akromelična dismorfična obilježja, intelektualne poteškoće
Hipoplazija hrskavice i kose (engl. Cartilage-hair hypoplasia)	RMRP	AR	Nizak (patuljasti) rast s drugim skeletnim abnormalnostima, metafizna hondrodizplazija, labavost ligamenata, hipotrihoza,

			imunodeficijencija, ponavljajuće infekcije
Shwachman-Diamondov sindrom	SBDS, EFL1, DNAJC21	AR	Blaga neutropenija, disgranulopoeza, blaga dismegakariopoeza, diseritropoeza, egzokrina insuficijencija gušterače, metafizna displazija, kognitivna oštećenja, kardiomiopatija, nenapredovanje, abnormalnosti kose/kože/zuba
SAMD9/SAMD9L sindromi	SAMD9/SAMD9L	AD	Insuficijencija nadbubrežne žlijezde, kongenitalne malformacije, cerebelarna ataksija, teške invazivne infekcije, predispozicija za MDS
SRP54 mutacija	SRP54	AD	Zaustavljanje sazrijevanja, teški zastoj u neurološkom razvoju, egzokrina disfunkcija gušterače
Bolesti uzrokovane poremećajem telomera	DKC1	X-vezano	Mukokutana obilježja, fibroza jetre, idiopatska plućna fibroza, predispozicija za rak
	hTR, TERT, TINF2, DKC1, ACD	AD	
	TERT, NHP2, NOP10, WRAP53, NOLA3, TCB1, RTEL1, CTC1, PARN	AR	
engl. U6 small nuclear RNA biogenesis	USB1 (Clericuzio sindrom, poikiloderma s neutropenijom)	AR	Retinopatija, kašnjenje u razvoju, facijalna dismorfija, poikiloderma

AD = autosomno dominantno, AR = autosomno recesivno, ALPS = autoimuni limfoproliferativni sindrom, MDS = mijelodisplastični sindrom, AML = akutna mijeloična leukemija, FHLH = obiteljska hemofagocitna limfohistiocitoza, HPV = humani papiloma virus, IBD = upalna bolest crijeva, HSM = hepatosplenomegalija, ZKS = zatajenje koštane srži

5.4. Klinička slika

Kod poremećaja neutrofilne proizvodnje i otpuštanja iz koštane srži postoji veći rizik od bakterijskih i gljivičnih infekcija nego kod periferne neutropenije povezane s koštanom srži normalne morfologije. Rizik za infekciju kod centralne neutropenije raste umjereno ako je broj neutrofila između $1,0 \times 10^9 /L$ i $0,2 \times 10^9 /L$, a rizik za osobito teške infekcije ukoliko je manji od $0,2 \times 10^9 /L$. Rizik od gljivičnih infekcija raste nakon nekoliko tjedana trajanja neutropenije (5). Ipak, rizik i težina infekcije ne ovise isključivo o broju neutrofila u perifernoj krvi već i o sposobnosti pojedinca za regrutaciju i dostavu neutrofila do ciljnih tkiva (7). Mjesta nastanka infekcija i zahvaćeni organski sustavi vrlo su varijabilni. Najčešće su zahvaćeni koža i sluznice, regija uha, grla i nosa te pluća (5). Simptomi i znakovi teške kongenitalne neutropenije javljaju se već u ranom djetinjstvu. Novorođenčad se često prezentira akutnim i teškim infekcijama pupka već tijekom prvih dana života, a tijekom prvih tjedana mogu se javiti vrućice s respiratornim simptomima uključujući i pneumonije. Tijekom prvih nekoliko tjedana ili mjeseci života mogu se javljati apscesi dubokih tkiva i celulitisi, a tijekom prve dvije godine i teški gingivitis i paradontitis (13). Gingivitis koji se pojavljuje kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom su erozivni, hemoragični i jako bolni, a uz njih se javljaju i papule jezika i sluznice obraza koje su nalik aftama. Ako se neutropenični pacijent prezentira proljevom ili bolovima u abdomenu trebamo uzeti u obzir postojanje difuznih gastrointestinalnih lezija koje mogu oponašati Chronovu bolest. Jedna od karakterističnih infekcija gastrointestinalnog trakta je također infektivna ulceracija perianalne regije (ecthyma gangrenosum). Najčešći gljivični uzročnici infekcija su *Candida* i *Aspergillus*, ali je ipak većina infekcija kod bolesnika s teškom kongenitalnom neutropenijom bakterijskog podrijetla. Najčešći bakterijski uzročnici su *Staphylococcus aureus* i *epidermidis*, streptokoki, enterokoki, pneumokoki, *Pseudomonas aeruginosa* i gram-negativni bacili (5). Postoje i neke vrlo specifične oportunističke infekcije koje se pojavljuju samo kod određenih entiteta. Primjer su HPV infekcije, tuberkuloza i infekcije uzrokovane atipičnim mikobakterijama koje možemo vidjeti kod pacijenata s WHIM sindromom, GATA2 sindromom i nedostatkom STK4 (26). Iako je neutropenija zajednička značajka svih oblika teške kongenitalne neutropenije, težina neutropenije varira čak i kod istog pacijenta kroz vrijeme (13). Također, važno je napomenuti i da simptomi infekcija kod pacijenata s

teškom neutropenijom zbog smanjene lokalne upalne reakcije ne moraju biti tipični, što rezultira nedostatkom gnoja i manjom tendencijom za stvaranje nekroze (5,50).

Kongenitalne neutropenije mogu biti uzrokovane mutacijama gena koje će se osim neutropenijom, manifestirati simptomima brojnih nehematoloških organskih sustava. Stoga je osim znakova infekcija karakterističnih za sve oblike kongenitalnih neutropenija, važno spomenuti i ekstrahematološke simptome koji se javljaju samo kod određenih kliničkih entiteta. Srčana disfunkcija može biti uzrokovana različitim mehanizmima u kongenitalnim neutropenijama. U Shwachman-Diamond sindromu javlja se u sklopu kardiomiopatije (51), u WHIM sindromu može se pronaći tetralogija Fallot (52), kod mutacije STK4 javlja se atrijski septalni defekt (53), a aritmije kod mutacije gena G6PC3 (54). U sklopu Barthovog sindroma, srčana disfunkcija može biti uzrokovana dilatativnom kardiomiopatijom (55). Poremećaji u neurološkom razvoju javljaju se kod Kostmannovog sindroma (56), Shwachman-Diamond sindroma (57) i Cohenove bolesti (58), a različite neurološke manifestacije vide se i kod mutacija gena poput CLBP, SRP54 i VPS45 (38). Egzokrina insuficijencija gušterače je vodeći uzrok morbiditeta pacijenata sa Shwachman-Diamond sindromom (59). Lezije kože koje vidamo kod Clericuzio neutropenije (mutacija gena USB1) karakterizira atrofija kože te papularni eritematozni osip. Jedan od najčešćih simptoma zahvaćenosti kože je kompletni ili parcijalni albinizam koji kod većine sindroma uz koje se javlja, poprima okulokutanu formu (38). Primjeri ostalih zahvaćenih organa i organskih sustava su kosti (mutacija gena SBDS), urogenitalni sustav (mutacija gena G6PC3), probavni sustav (mutacije gena G6PC3 i SLC37A4) te jetra (mutacija gena SLC37A4) (13,26).

5.5. Molekularna pozadina nekih kliničkih entiteta

Zahvaljujući sve široj upotrebi metoda sekvenciranja gena moguć je pronalazak novih gena povezanih s nastankom kongenitalnih neutropenija i sve bolje razumijevanje molekularne pozadine njihovog nastanka. Stoga je predloženo da se mutirani geni odgovorni za nastanak teških kongenitalnih neutropenija mogu klasificirati i s obzirom na funkciju proteinskog produkta određenog gena. Podjela gena u takve podgrupe omogućava nam promatranje i proučavanje mehanizama koji su doveli do gubitka funkcije neutrofila i posljedično do razvitka bolesti (38). U ovom poglavlju opisuju se mutirani geni grupirani po kontekstu sličnih patomehanizama djelovanja proteina za koje ti geni kodiraju. Mutirani geni uzeti kao primjer, kodiraju proteine važne za normalno funkcioniranje neutrofilnih granula (ELANE), regulaciju apoptoze i staničnog ciklusa (HAX1, STK4, TFAZZIN), regulaciju neutrofilnog otpuštanja iz koštane srži (CXCR2, CXCR4) ili imaju ulogu transportera (SLC37A4). Ovo je samo manji dio postojećih kliničkih entiteta i identificiranih molekularnih pozadina njihovog nastanka.

5.5.1. Defekti granula

ELANE mutacije - Teška kongenitalna neutropenija (TKN) i ciklička neutropenija (CyN)

Mutacije gena ELANE najčešći su poznati uzrok kongenitalne neutropenije. Uzrokuju cikličku i tešku kongenitalnu neutropeniju koje se nasljeđuju autosomno dominantno (5). ELANE mutacija prvi put je opisana 1999. godine analizom gena unutar 13 obitelji s dugogodišnjom poviješću cikličke neutropenije (48). U usporedbi s drugim formama kongenitalnih neutropenija, neutropenije uzrokovane mutacijama u genu ELANE povezane su s najtežim infektivnim komplikacijama (5,60). Genotipizacija kao jedina pretraga nije dovoljna za postavljanje dijagnoze s obzirom na to da dolazi do preklapanja u mutacijama koje uzrokuju tešku kongenitalnu i cikličku neutropeniju (49,61,62). Osim preklapanja u molekularnoj podlozi, ponekad ih je teško razlikovati i po kliničkoj slici. Oscilacije u broju neutrofila karakteristične za cikličku neutropeniju mogu privremeno biti prisutne i u teškim kongenitalnim neutropenijama. Nadalje, pacijenti s cikličkom

neutropenijom ne moraju pokazivati jasan obrazac oscilacije u broju neutrofila (49). Ponekad se ova dva entiteta zato promatraju i kao dio kontinuuma iste bolesti (5).

Teška kongenitalna neutropenija (TKN)

Mutacije gena ELANE najčešći su uzrok teške kongenitalne neutropenije i mogu se vidjeti kod 40-60% pacijenata. TKN uzrokovanu mutacijom gena ELANE karakterizira zastoj u sazrijevanju neutrofila u stadiju promijelocita, vrijednost apsolutnog broja neutrofila u perifernoj krvi manja od $0,5 \times 10^9 /L$ i rani početak teških bakterijskih infekcija (13,25). Često se mogu vidjeti i monocitoza, hipereozinofilija te hipergamaglobulinemija u krvi. Dijagnoza teške kongenitalne neutropenije uzrokovane mutacijom ELANE uglavnom se postavlja prije dobi od 6 mjeseci. Ovi pacijenti zahtijevaju visoke doze G-CSF-a te imaju visok rizik za leukemičnu transformaciju (5). Klinički se često manifestiraju infekcijama dubokih tkiva i pneumonijama s teškim oporavkom (15).

Ciklička neutropenija (CyN)

Ciklička neutropenija definira se oscilacijom u apsolutnom broju neutrofila (ABN) s tipičnim padom u broju neutrofila svakih 21 do 28 dana. Periodičnost u padu broja neutrofila može se odražavati i na oscilacije u broju trombocita, a ponekad i broju retikulocita te limfocita (21,61). U prvoj fazi ciklusa su vrijednosti ABN-a u krvi izrazito niske, a često mogu dosegnuti i nulu. Nakon 3-5 dana u drugom dijelu ciklusa, broj neutrofila se brzo oporavlja obično do vrijednosti od $2,0 \times 10^9 /L$ (15). Nakon nekoliko dana od tog vrhunca, razina neutrofila opet počinje padati. Sumnja na cikličku neutropeniju treba biti potvrđena mjerenjem vrijednosti apsolutnog broja neutrofila dva do tri puta tjedno tijekom perioda od 4-6 tjedana. Mutacije gena ELANE povezane su s cikličkom neutropenijom u približno 60 % slučajeva (23). Ciklička neutropenija se smatra manje teškom bolešću od teške kongenitalne neutropenije, iako i ona nosi nezanemariv rizik od teških infekcija kad su vrijednosti broja neutrofila na najnižoj razini. Dijagnoza se uglavnom postavlja tijekom ili nakon druge godine života, a glavna klinička manifestacija

je postojanje rekurentnih afti (5). Pacijenti koji boluju od cikličke neutropenije imaju povećanu sklonost za razvoj infekcija uzrokovanih bakterijama iz roda *Clostridium* (15). Ciklička neutropenija ima niži rizik za malignu transformaciju u MDS ili AML i manji morbiditet (61). Razumijevanje patofiziološkog mehanizma regularnosti u oscilaciji broja neutrofila još uvijek predstavlja izazov. To je navelo i neke matematičare da predlože svoj model za njegovo objašnjenje. Prvi model napravljen u tu svrhu temelji se na pretpostavci da se proizvodnja neutrofila odvija pod kontrolom stimulacijskih faktora dalekog dometa (G-CSF) mehanizmom dugačke negativne povratne sprege. Druga važna pretpostavka za razumijevanje dinamike u proizvodnji neutrofila je postojanje signifikantnog kašnjenja od trenutka dolaska kontrolnog signala do ciljnih stanica (nezrelih neutrofilnih prekursora) do postizanja njegovog potpunog učinka (povišenje broja zrelih cirkulirajućih neutrofila). To je vrijeme potrebno za diferencijaciju iz progenitorske stanice u zreli neutrofil (64,65). Autor ovog modela, postavio je hipotezu da bi ometanja u ranom stadiju proizvodnje neutrofila mogla biti uzrokom oscilacija u ABN-u. U skladu s tom hipotezom, oscilacija u broju neutrofila događa se ako uz osnovnu mutaciju gena, postoje i drugi genetski ili stečeni poremećaji koji utječu na rani stadij proliferacije mijeloidnih stanica (15). Primjena G-CSF-a kod pacijenata s cikličkom neutropenijom najčešće ne prekida oscilaciju, ali povećava ABN, skraćuje trajanje perioda oscilacije na 14 dana i prevenira nastanak teških infekcija (66).

Molekularna pozadina

Gen ELANE kodira za neutrofilnu elastazu (NE). Radi se o citotoksičnoj serinskoj proteazi sintetiziranoj pretežito u promijelocitnom stadiju. Otpušta se pri neutrofilnoj aktivaciji na mjestu upale iz azurofilnih granula u kojima je primarno pohranjena u svojoj aktivnoj formi (13). Neutrofilna elastaza sintetizira se u inaktivnoj proenzimskoj formi čija aktivacija ovisi o fuziji neutrofilnih granula s fagolizosomom (38). Nakon što je potpuno funkcionalan enzim otpušten, ostvaruje svoju optimalnu ne-oksidacijsku antimikrobnu funkciju i regulira imunološki sustav u neutralnoj okolini. Neutrofilna elastaza hidrolizira različite proteinske supstrate uključujući receptore na površini stanica, koagulacijske proteine, faktore rasta, unutarstanične signalne molekule i proteine ekstracelularnog matriksa (13,38,67). Otkriveno je više od 200 različitih ELANE mutacija nasumično raspoređenih duž cijelih egzona i introna 3 i 4 (13,62). Iako je poznat doprinos i važnost mutacije gena ELANE kao najčešćeg uzroka teške kongenitalne neutropenije, točni patofiziološki mehanizmi nastanka neutropenije dugo su bili predmetom rasprave (38). Smatra se da su strukturni poremećaji proteina neutrofilne elastaze zaslužniji od funkcionalnih u ometanju granulopoeze (68). Jedan od potencijalnih mehanizama odgovornih za gubitak funkcije neutrofila povezan je s odgovorom na nefunkcionalne proteine (*engl. UPR-unfolded protein response*) odnosno s apoptozom uzrokovanom prolongiranom UPR aktivacijom. Radi se o intracelularnom signalnom putu koji se aktivira kao odgovor endoplazmatskog retikuluma (ER) na ER stres uzrokovan nakupljanjem pogrešno složenih proteina neutrofilne elastaze u njegovom lumenu. Slaganje proteina je dinamičan i nesavršen proces koji se odvija u specijaliziranim uvjetima unutar endoplazmatskog retikuluma, a ovisan je o mnoštvu faktora. Svaka mutacija inicijalno aktivira UPR koji reprogramira transkripciju kako bi povećao kapacitet ER-a za degradaciju pogrešno složenih proteina. Iako ovi adaptivni odgovori služe kako bi zaštitili stanicu od stresa unutar endoplazmatskog retikuluma, pri uvjetima izraženog stresa oni su nadvladani (preplavljeni) pa dolazi do narušavanja homeostaze. Nesrazmjer između pogrešno složenih proteina i kapaciteta endoplazmatskog retikuluma dovodi do stanja koje nazivamo ER stres i posljedično do ER stresom inducirane apoptoze (38,68–70). Iako prevladava hipoteza da stanični stres uzrokovan pogrešno složenim proteinima neutrofilne elastaze izaziva neutropeniju, postoji širok spektar ELANE mutacija koje ne

izazivaju pogrešno slaganje proteina neutrofilne elastaze. Stoga se može pretpostaviti da postoje i alternativni mehanizmi kojim mutacije gena ELANE mogu dovesti do neutropenije. Navedena heterogenost u mutacijama mogla bi biti i potencijalno objašnjenje varijabilnosti u odgovoru na liječenje G-CSF-om kod različitih pacijenata kao i različitog rizika za razvoj leukemije. Studija A. Olofsen i sur. iz 2021. godine pokazala je da postoje povišene razine promijelocitnog leukemičnog proteina u nuklearnim tjelešcima (PML) u hematopoetskoj matičnoj stanici pacijenata kod kojih ELANE mutacija izaziva pogrešno slaganje proteina neutrofilne elastaze. PML je marker za akutni oksidativni stres budući da se otpušta kao odgovor na povišene razine reaktivnih kisikovih radikala (ROS), a sudjeluje u procesu degradacije pogrešno složenih proteina. Osim toga, djeluje i na ekspresiju gena ELANE kao i na metabolički status hematopoetskih matičnih stanica koje su mutanti za gen ELANE. Iz toga se može zaključiti da ima ulogu u mehanizmu povratne sprege pri razvoju bolesti. Delecijom PML-a kao i ispravljanjem mutacije ELANE vraća se odgovor na G-CSF hematopoetskih matičnih stanica mutanata za ELANE gen. Ovaj podatak mogao bi biti važan za primjenu G-CSF-a u terapiji (71). Potpune delecije gena ELANE nisu opisane kao jedan od patofizioloških mehanizama nastanka teških kongenitalnih neutropenija te se gubitak ELANE gena u kontekstu teške kongenitalne neutropenije smatra manje štetnim od defekta gena koji vodi do promjene strukture samog gena. Neke besmislene mutacije i one koje dovode do pomaka okvira čitanja rezultiraju preranim završetkom proteinskog lanca. Takve varijante ELANE mutacija pronađene su samo kod pacijenata koji boluju od cikličke neutropenije (38). Pojedine ELANE mutacije kao što su p.C151Y ili p.G214R identificirane su kao uzrok težih fenotipova ove bolesti s obzirom na povećan rizik leukomogeneze, teških infekcija i slabijeg odgovora na terapiju G-CSF-om (13).

5.5.2. Regulacija apoptoze i staničnog ciklusa

HAX1 mutacije - Kostmannov sindrom

Kostmannov sindrom

Kostmannov sindrom nastaje kao posljedica mutacije gena HAX1 koja se nasljeđuje autosomno recesivno, osobito među populacijama za koje je karakterističan konsangvinitet (72). Tu je bolest opisao Rolf Kostmann 1956. godine nazivajući je “novorođenačkom agranulocitozom”. Karakterizirale su je 3 značajke: teška neutropenija s brojem neutrofila manjim od $0,2 \times 10^9$ /L koja se pojavljivala tijekom prvih nekoliko tjedana života, maturacijski arrest u promijelocitnom stadiju i smrt uzrokovana teškim bakterijskim infekcijama (11 od 14 promatranih pacijenata umrlo je od infekcija tijekom prve godine života). U svojoj studiji Kostmann je opisao 14 djece koji su potjecali iz 9 različitih obitelji, a živjeli su na geografski izoliranom dijelu Švedske (20). I danas je u primjeni naziv Kostmannov sindrom za navedeni entitet, a ponekad se pogrešno koristi i za teške kongenitalne neutropenije uzrokovane mutacijom gena ELANE (5,20). Učestalost ovog entiteta nije točno poznata, ali se smatra puno rjeđim od neutropenija uzrokovanih ELANE mutacijom. Glavna klinička značajka je teška neutropenija s monocitozom, reaktivnom eozinofilijom i velikom sklonošću za bakterijske infekcije koje se pojavljuju već u prvim tjednima života (5). Mutacija HAX1 gena uzrokuje zastoj u sazrijevanju neutrofila u stadiju promijelocita slično pacijentima s ELANE mutacijom. Također, postoji približno isti rizik za MDS/AML transformaciju kao i kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom uzrokovanom mutacijom gena ELANE (15). Otkrivene su dvije HAX1 izoforme. Mutacije koje zahvaćaju obje izoforme, osim teškom kongenitalnom neutropenijom očituju se i neurološkim simptomima koji uključuju epilepsiju i kašnjenje u neurološkom razvoju (73). Također, zamijećene su učestale abnormalnosti u razvoju reproduktivnog sustava kod žena s kongenitalnom neutropenijom uzrokovanom HAX1 mutacijom (74).

Molekularna pozadina

HAX1 gen kodira za ubikvitarno eksprimiran protein HAX-1 lokaliziran unutar mitohondrijske membrane, endoplazmatskog retikuluma i citoplazme. Osim raznolikih lokalizacija na kojima se nalazi, HAX-1 protein sudjeluje i u raznim staničnim procesima uključujući signalnu transdukciju, citoskeletnu kontrolu te djeluje kao antiapoptotski signal (72). Mitohondriji su prepoznati kao ključni regulatori apoptoze u neutrofilima (75). HAX-1 protein igra ključnu ulogu u očuvanju potencijala unutarnje mitohondrijske membrane i zaštiti mijeloidne stanice od apoptoze. Neutrofili pacijenata s HAX-1 mutacijama pokazuju veću učestalost spontanih apoptoza kao i apoptoza induciranih citokinom TNF- α (72). Nedavno je otkriven CLBP, protein koji djeluje kao kritični partner HAX-1 proteina u stanici. CLBP/HAX1 os regulira ravnotežu u sintezi mitohondrijskih proteina nužnih za normalno funkcioniranje mitohondrija. Otkriveno je i da se dio pacijenata s CLBP mutacijom manifestira moždanom disfunkcijom i kongenitalnom neutropenijom (76). Aktivacija G-CSFR vezanjem liganda inducira proliferaciju, preživljenje i diferencijaciju mijeloidnih stanica. Defekti nizvodno u signalnom putu nakon aktivacije receptora, prekidaju mijeloidnu diferencijaciju i mogu voditi ili u leukemičnu transformaciju ili u nastanak neutropenije (77). HAX-1 protein je konstitutivno povezan s HCLS1 proteinom i nužan je za njegovu interakciju s LEF-1 transkripcijskim faktorom. Stimulacija G-CSF-om dovodi do fosforilacije HCLS1 proteina što mu omogućava vezanje s LEF-1 transkripcijskim faktorom. Kod pacijenata s naslijeđenim HAX1 mutacijama dolazi do teških poremećaja u G-CSF-om stimuliranoj fosforilaciji HCLS1 proteina i posljedično do smanjene autoregulacije i ekspresije faktora LEF-1 te zastoja u mijeloidnoj diferencijaciji (78).

STK4 mutacija

STK4 je još jedan gen uključen u regulaciju apoptoze, a mutiran ima ulogu u nastanku nekih oblika kongenitalne neutropenije koji se nasljeđuju autosomno recesivno. STK4 može imati proapoptotski kao i antiapoptotski učinak ovisno o uvjetima u kojima se nalazi. U normalnim je uvjetima smješten u citoplazmi gdje u odgovoru na apoptotski signal sudjeluje u procesu apoptoze. Osim toga, u interakciji s RASSF1A djeluje kao promotor u RAS posredovanom apoptotskom signalnom putu. Ova njegova uloga objašnjava srčane defekte uočene kod pacijenata sa STK4 mutacijama. Naime, u srčanom mišiću nakon aktivacije s RASSF1A, osim što promovira apoptozu srčanih stanica, STK4 također inhibira proliferaciju fibroblasta kontrolirajući na taj način srčanu remodelaciju (38).

TAFAZZIN gen mutacija: Barthov sindrom

Barthov sindrom

Barthov sindrom je rijetka bolest karakterizirana umjerenom do teškom neutropenijom, dilatativnom kardiomiopatijom, miopatijom i poremećajem rasta koja se nasljeđuje X-vezano recesivno (79). Etiologija nastanka Barthovog sindroma je mutacija koja uzrokuje gubitak funkcije gena TAFAZZIN (TAZ gen) (80,81). Težina neutropenije značajno varira, a kod mnogih se pacijenata pronalazi i monocitoza u krvi. Razina neutrofila u krvi može, ali vrlo rijetko, pokazivati i cikličke oscilacije (15). Dijagnoza se obično postavlja na temelju pojave simptoma srčanog zatajenja, iako se neki pacijenti prezentiraju i simptomima akutne bakterijske infekcije praćene neutropenijom (55). Osobit problem predstavljaju pneumonije i ostale respiratorne infekcije. Srčanom transplantacijom ispravljaju se miokardijalne abnormalnosti, a liječenje G-CSF-om pokazalo se kao vrlo učinkovito u zbrinjavanju neutropenije (15).

Molekularna pozadina

Proteinski produkt gena TFAZZIN je protein mitohondrijske membrane čija je uloga očuvanje strukturalnog integriteta mitohondrija. Uključen je i u remodelaciju glavnog lipida unutarne mitohondrijske membrane kardiolipina. Pacijenti s Barthovim sindromom pokazuju defekte u metabolizmu kardiolipina uz značajno smanjene razine istoga u krvi. U studiji Makaryan i sur. (2012.) pokazano je da u mijeloidnim stanicama sa smanjenom ekspresijom TFAZZIN gena, dolazi do poremećaja u potencijalima mitohondrijske membrane. To posljedično dovodi do programirane stanične smrti. U mutiranim mijeloidnim progenitorskim stanicama sa smanjenom ekspresijom TFAZZIN gena uočeno je abnormalno otpuštanje citokroma c iz mitohondrija oštećene strukture. Taj događaj praćen aktivacijom kaspaze 3, igra glavnu ulogu u ubrzanoj apoptozi humane progenitorske mijeloidne stanice i nastanku neutropenije. Činjenica da je ubrzana apoptoza mijeloidnih progenitorskih stanica s nokautiranim TFAZZIN genom (korištenih u ovoj studiji) praćena aktivacijom kaspaze 3, sugerira da bi specifični inhibitori kaspaze mogli biti korisni u blokiranju ubrzane apoptoze stanica. Uloga specifičnih inhibitora kaspaza (zVAD-fmk) u liječenju patoloških stanja vezanih uz povećanu aktivnost kaspaza, trenutno se dokazuje u nekim kliničkim istraživanjima. Postoji mogućnost da to uskoro postane i novi lijek za liječenje neutropenija u sklopu Barthovog sindroma (81).

5.5.3. Regulatori neutrofilnog otpuštanja iz koštane srži

CXCR4 i CXCR2 mutacije - WHIM sindrom

WHIM sindrom

WHIM sindrom je autosomno dominantna kombinirana imunodeficijencija uzrokovana heterozigotnom mutacijom u genu koji kodira za CXCR4. Navedene mutacije dovode do defekta u strukturi receptora koji pokazuje oštećenu internalizaciju i pojačanu signalizaciju što rezultira abnormalnom retencijom neutrofila u koštanoj srži (mijelokateksija) i posljedično kroničnom neutropenijom. Stoga pacijenti s WHIM sindromom imaju snižen broj neutrofila u perifernoj krvi unatoč normalnom broju zrelih neutrofila u koštanoj srži (82). Radi se o nekoliko poremećaja čiji su engleski nazivi obuhvaćeni akronimom WHIM: bradavice (*engl. warts*), hipogamaglobulinemija, infekcije i mijelokateksija (83,84).

WHIM sindrom 2 je naziv koji se ponekad koristi za bolest uzrokovanu homozigotnim mutacijama gena koji kodira CXCR2. Iako točan mehanizam nastanka kongenitalne neutropenije u ovom entitetu nije u potpunosti razjašnjen, znamo da je on različit od onog kod WHIM sindroma. Po dosad prikupljenim podacima, čini se da specifične mutacije u N-terminalnoj domeni utječu na kemotaksijski odgovor neutrofila predvođen CXCL8 kemokinom. Smatra se da bi potencijalan primarni problem moglo biti oštećenje neutrofilne homeostaze, budući da se mijelokateksija ili poremećen kemotaksijski odgovor ne moraju javiti kod svih oboljelih (38,85).

Molekularna pozadina

Koštana srž osim kao mjesto proizvodnje krvnih stanica služi i kao skladište gdje se pohranjuju zrele neutrofilne rezerve tijekom 4-6 dana. To omogućava neutrofilima da se u odgovoru na ozljedu ili infekciju brzo mobiliziraju i da im se razina u krvi znatno povisi u manje od sat vremena. U tom procesu sudjeluju brojni regulatori od kojih su najvažniji receptori CXCR4 i CXCR2 koji imaju suprotan i antagonistički učinak (82). Aktivacija CXCR2 potaknuta kemokinima iz porodice CXCL8 promovira otpuštanje neutrofila iz

koštane srži (38). Pod uvjetima homeostaze, neutrofili ostaju u koštanoj srži zahvaljujući konstitutivnoj proizvodnji CXCL12 od stromalnih stanica i neutrofilnoj ekspresiji CXCR4. Smatra se da dolazi do efekta smanjenja broja CXCR4 na površini neutrofila u koštanoj srži (*engl. down-regulation*) kao posljedica njegove konstantne aktivacije pri izloženosti visokim razinama CXCL12 proizvedenima lokalno. To služi kao retencijski signal. Suprotno tome, pri sniženju razine CXCL12 ubrzo dolazi do obrnutog procesa i povećanja broja CXCR4 na površini neutrofila (*engl. up-regulation*) (82). Važno je poznavanje ovog mehanizma radi lakšeg razumijevanja podloge nastanka neutropenije u sklopu WHIM sindroma.

5.5.4. Transporteri

Budući da je prijenos molekula nužan za normalno funkcioniranje svih stanica, mutacije u genima koji kodiraju za transportere, još su jedan od mehanizama nastanka kongenitalnih neutropenija. U ovoj skupini mutacija koje uzrokuju teške kongenitalne neutropenije, posebno su značajne mutacija gena SLC37A4 koji kodira za transporter glukoza-6-fosfata, gena TCN2 za transporter vitamina B12 i gena TCIRG1 čiji produkt djeluje kao dio protonskog kanala V-ATPaze (38).

Mutacije gena SLC37A4 - Glikogenoza tip 1b

Glikogenoza tip 1b

Kongenitalna neutropenija vezana uz mutaciju gena SLC37A4 javlja se u sklopu autosomno recesivne bolesti pohrane glikogena - glikogenoze tip 1b (86–88). Simptomi imunoloških poremećaja koji uključuju neutropeniju i mijeloidnu disfunkciju kao i upalne bolesti crijeva specifični su za glikogenozu tip 1b, dok su ostali simptomi koji se pojavljuju i u tipu 1a: hipoglikemija, pretjerano nakupljanje glikogena u jetri, poremećaji rasta, hiperlipidemija i laktacidemija (87,89,90). Liječenje G-CSF-om ispravlja neutropeniju, a obično popravlja i simptome upalne bolesti crijeva (91). Ipak, često pacijenti s glikogenozom tip 1b imaju splenomegaliju koja može dodatno rasti pod utjecajem G-CSF.

Stoga je važno primjenjivati najniže doze G-CSF-a koje će održavati vrijednost neutrofila na oko $1,0 \times 10^9$ /L. Transplantacija jetre ispravlja ovaj poremećaj, ali ne može ispraviti kroničnu neutropeniju koja se javlja ubrzo nakon rođenja (15).

Molekularna pozadina

Gen SLC37A4 kodira za transportere glukoza-6-fosfata (G6PT) (92,93). Glukoza-6-fosfat transporter je lokaliziran na membrani endoplazmatskog retikuluma, a zadaća mu je da olakšava translokaciju glukoza-6-fosfata u lumen endoplazmatskog retikuluma gdje hidrolizom nastaju glukoza i fosfat (89,94,95). Hidrolizu obavlja katalitička podjedinica enzima glukoza-6-fosfataze. Postoje 2 enzimski aktivne forme glukoza-6-fosfataze: G6Paza α primarno eksprimirana u organima u kojima se odvija glukoneogeneza te ubikvitarno izražena G6Paza β (96). Mutacija G6Paze β rezultira teškom kongenitalnom neutropenijom. Za neutrofile kao stanice u kojima se ne odvija glukoneogeneza, kompleks G6PT/G6Paza β igra važnu ulogu pri povećanju potreba za glukozom. To objašnjava zašto se pacijenti koji boluju od glikogenoze tip 1b kao i od nedostatka G6Paze β manifestiraju neutropenijom kad su izloženi povećanom stresu u endoplazmatskom retikulumu, oksidativnom stresu i apoptozi. Osim toga, uobičajeno za ove bolesti je i postojanje neutrofilne disfunkcije karakterizirane poremećajima respiratornog praska i kemotaksije (89). Neke studije su pregledom koštane srži ovih pacijenata zabilježile zastoj u sazrijevanju neutrofila (97,98).

5.6. Liječenje

Pacijenti s kongenitalnom neutropenijom zahtijevaju dvije osnovne metode liječenja: liječenje antibioticima u svrhu borbe protiv infekcija i primjenu lijekova koji će poticati proizvodnju neutrofila. U nekim slučajevima neophodna je transplantacija koštane srži (38).

5.6.1. G-CSF

G-CSF je ljudski citokin koji stimulira rast i diferencijaciju mijeloidnih progenitora te potiče njihovo sazrijevanje do stadija neutrofila (99). G-CSF je terapija prvog izbora za liječenje pacijenata s cikličkom neutropenijom i s različitim tipovima teške kongenitalne neutropenije (13). Uvođenje G-CSF-a u kliničku primjenu znatno je povećalo stope preživljenja oboljelih od teške kongenitalne neutropenije, smanjilo učestalost i težinu infekcija te znatno poboljšalo kvalitetu života oboljelih (100). U upotrebi postoje 3 forme G-CSF-a (101). **Filgrastim** označava bakterijski sintetiziranu rekombinantnu formu G-CSF-a. Nakon izoliranja i molekularnog kloniranja 1986. godine, prvo odobrenje za kliničku upotrebu dobiva 1991. godine u svrhu ublažavanja neutropenije pacijenata na kemoterapiji zbog primarne maligne bolesti. Budući da se njegova primjena pokazala učinkovitom u smanjenju broja infekcija i hospitalizacija pacijenata s malignom bolešću, ubrzo je odobren u sve više zemalja za liječenje različitih stanja među kojima su i teške kronične neutropenije. **Lenograstim** je glikozilirana forma rekombinantnog G-CSF-a odobrena 1993. godine u Europi, sličnih bioloških svojstava kao filgrastim (100). **Pegfilgrastim** predstavlja formu filgrastima vezanu za polietilen glikol (102). Budući da ima dug poluživot i omogućava značajno rjeđu primjenu injekcija, ova pegilirana forma filgrastima mogla bi poboljšati suradljivost pacijenata u primjeni terapije. Nedavno se počeo koristiti u svrhu skraćivanja trajanja neutropenije kod pacijenata sa solidnim tumorima i za mobilizaciju matičnih stanica u svrhu autotransplantacije. Podatci o učinkovitosti njegove primjene u neutropenijama koje nisu povezane s malignitetom su oskudni. Potrebne su studije s dugotrajnim praćenjem kako bi se uočili kasni učinci pegfilgrastima i njegov potencijalan utjecaj na leukemogenezu. Primjena pegfilgrastima u

situacijama u kojima pacijent ne tolerira standardnu terapiju G-CSF-om ili ona nije učinkovita, djeluje obećavajuće (103).

Postoje dva obrasca primjene G-CSF-a kod neutropeničnih pacijenata: po potrebi ili dugoročno. Dugoročna primjena G-CSF-a označava njegovu primjenu tijekom duljeg perioda (ponekad i doživotno) neovisno o postojanju aktivne infekcije. Može se primjenjivati svaki dan ili intermitentno, ovisno o potrebama i odgovoru pacijenta. Dugoročna primjena G-CSF-a je potrebna za pacijente s teškom kongenitalnom neutropenijom, cikličkom neutropenijom i kod nekih tipova kongenitalne neutropenije povezanih s drugim patološkim stanjima kao što je glikogenoza tip 1b. Kontinuirana primjena G-CSF-a može se razmotriti i kod pacijenata s idiopatskom ili autoimunom neutropenijom u kojoj rekurentne infekcije znatno narušavaju kvalitetu života tog pacijenta ili se radi o teškim infekcijama (101). Primjena G-CSF-a po potrebi odnosi se na terapiju G-CSF-om ograničena trajanja. Indicirana je kod autoimune i idiopatske neutropenije u slučajevima prolongirane vrućice (temperature >38 °C koja traje duže od 3 dana) ili u posebnim situacijama kao što je profilaksa prije operacije (23). Kod neutropeničnog pacijenta čije se stanje brzo pogoršava, ima po život opasnu infekciju ili se nalazi u stanju septičkog šoka, preporučljivo je primjenu G-CSF-a započeti prvi dan vrućice i prekinuti nakon završetka infekcije, neovisno o broju neutrofila u perifernoj krvi (23,101). Primjena G-CSF-a ima snažan utjecaj na povećanje broja neutrofila, ali se unatoč njegovoj primjeni cjelokupna funkcija neutrofila ne može vratiti u potpunosti (13). Ipak, G-CSF pokazuje brojne učinke na poboljšanje funkcije neutrofila. Stimulira metaboličke procese vezane uz fagocitozu, a potiče i proizvodnju brojnih neutrofilnih antibakterijskih proteina (13,104)

Primjena G-CSF-a u različitim kliničkim entitetima

Primjena G-CSF-a je najučinkovitija u svrhu preventivnog liječenja. Međutim, pacijenti s teškom kongenitalnom neutropenijom koji se prezentiraju infekcijom trebali bi što prije početi primati terapiju kombinacijom antibiotika i G-CSF-a (13). Neovisno u kojem tipu neutropenije se primjenjuje, glavni cilj terapije G-CSF-om je postizanje dobre kontrole infekcija. To se uglavnom postiže pri vrijednostima ABN-a između $1,0 \times 10^9$ /L i $5,0 \times 10^9$ /L (101). Doza i učestalost davanja G-CSF-a započinje se i prilagođava ovisno o tipu neutropenije. Optimalno bi bilo započeti terapiju minimalnom efektivnom dozom G-CSF-a kojom će se postići ciljane kontrole infekcija, ali izbjeći pretjerana stimulacija matične stanice i veće nuspojave (41,101). U većini slučajeva, terapija se započinje subkutanom dnevnom primjenom niske (1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na dan) ili umjerene (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na dan) doze G-CSF-a, a po potrebi se doza postupno povisuje dok pacijent ne dostigne i održava vrijednost ABN-a veću od $1,0 \times 10^9$ /L. To je razina neutrofila dovoljna za ublažavanje simptoma (13).

Teška kongenitalna neutropenija

Pacijenti s teškom kongenitalnom neutropenijom zahtijevaju što prije transplantaciju matičnih krvotvornih stanica. Ako je to neizvedivo daje se G-CSF. Standardna doza G-CSF-a za postizanje terapijskih ciljnih vrijednosti ABN-a (između $1,0 \times 10^9$ /L i $5,0 \times 10^9$ /L) iznosi 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$, ali se ona može modificirati ovisno o odgovoru pojedinca. Ukoliko se unutar 7 dana ne postigne vrijednost neutrofila veća od $1,0 \times 10^9$ /L, potrebno je postupno povećavati dozu za 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ svakih 5 do 7 dana (101). Pacijenti koji s terapijskom dozom višom od 10 i 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ ne postižu vrijednosti ABN-a od $1,5 \times 10^9$ /L <, smatraju se pacijentima koji ne odgovaraju ili slabo odgovaraju na terapiju G-CSF-om (23). Studija talijanskog registra neutropenija (*engl. Italian Registry of Neutropenia*) predlaže pegfilgrastim kao potencijalnu alternativnu terapijsku opciju za ove pacijente budući da se pokazalo da podiže vrijednosti ABN-a i smanjuje učestalost pojave infekcija, s prihvatljivim nuspojavama (103).

Ciklička neutropenija

U cikličkoj neutropeniji, G-CSF smanjuje učestalost teških infekcija, skraćuje period trajanja i smanjuje težinu neutropenije (66). Pacijenti s cikličkom neutropenijom uglavnom zahtijevaju niže doze G-CSF-a od onih s teškom kongenitalnom neutropenijom. Inicijalna doza od 1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ trebala bi održavati vrijednosti ABN oko $1,5 \times 10^9/\text{L}$ (101). Postoje različite preporuke za učestalost i doze primjene G-CSF-a u cikličkoj neutropeniji. Neki autori preporučuju intermitentan raspored davanja doze od 7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ tijekom 3 dana u tjednu ili 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ u trajanju od jednog tjedna, svaka 3 tjedna uz pretpostavku pravilnosti neutropeničnih faza (101,105). Uglavnom se učestalost i raspored primjene G-CSF-a prilagođava tipu ciklusa i pojavi infekcija. Injekcija se može davati jednom dnevno, svaki drugi dan ili samo u neutropeničnoj fazi ciklusa. Ukoliko se s inicijalnim dozama od 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ ne postigne ciljna vrijednost neutrofila (između $1,0 \times 10^9/\text{L}$ i $5,0 \times 10^9/\text{L}$), preporuča se nakon iduće neutropenične faze povišavati dozu za 2 $\mu\text{g}/\text{dan}/\text{kg}$ svaka 2-4 neutropenična perioda (101).

5.6.2. Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (HSCT) kod pacijenata s teškim kongenitalnim neutropenijama

Alogena transplantacija hematopoetskih matičnih stanica predstavlja jedino kurativno rješenje za dvije skupine pacijenata: pacijente rezistentne na G-CSF i one kod kojih je došlo do maligne transformacije u akutnu leukemiju ili mijelodisplastični sindrom. Sama procedura nosi određeni rizik od smrtnosti vezane uz terapijski postupak te je potrebno precizno odvagovati prednosti u odnosu na rizike ovog postupka (106). Kod pacijenata rezistentnih na terapiju G-CSF-om nakon uspješne transplantacije dolazi do stabilizacije u apsolutnom broju neutrofila u perifernoj krvi. Takvi pacijenti više ne zahtijevaju terapiju G-CSF-om. Pacijenti koji razviju AML ili MDS imaju jako niske šanse za preživljenje ako se ne učini transplantacija hematopoetskih matičnih stanica (13). Velika studija o transplantaciji matičnih stanica kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom provedena na EBMT (*engl. European Bone Marrow Transplantation*) kohorti (107), procijenila je stopu smrtnosti vezanu uz transplantaciju na približno 17 %. To bi govorilo u prilog tvrdnji da HSCT nije metoda prikladna za pacijente koji mogu biti zbrinuti niskim

ili standardnim dozama G-CSF-a. U ovoj studiji, bolji ishod pokazali su pacijenti mlađi od 10 godina liječeni prije 2000. godine, koji su koštanu srž primili od podudarnih donora među braćom i sestrama i drugih srodnih donora. Također se koštana srž pokazala boljim izvorom stanica od periferne krvi i krvi iz pupkovine (107). Smrtnost vezana uz transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica pripisuje se stanjima kao što su akutna ili kronična reakcija transplantata protiv primatelja (GvHD), bakterijske ili virusne infekcije te povećani rizik za razvoj sekundarnog maligniteta kao posljedica kemoterapije i radioterapije (13). Zaključno, HSCT se apsolutno preporuča kod pacijenata u kojih je došlo do transformacije u mijelodisplastični sindrom ili akutnu leukemiju te kod pacijenata koji se prezentiraju displastičnim značajkama nositelja kariotipskih abnormalnosti visokog rizika (monosomija 7 i trisomija 8). U skupinu pacijenata kojima se preporuča HSCT spadaju oni koji boluju od tipova kongenitalnih neutropenija uzrokovanih mutacijama koje ujedno nose i visok intrinzični rizik za leukemičnu progresiju (npr. GATA2 mutacija) kao i oni s kombinacijom stečenih somatskih mutacija RUNX1 i CSF3R s prepoznatim rizikom za malignu transformaciju. U svim ostalim slučajevima potrebno je detaljno razmotriti sve prednosti i mane ovog terapijskog postupka. Treba uzeti u obzir činjenicu da će zbrinjavanje pacijenta s teškom kongenitalnom neutropenijom uvelike ovisiti i o iskustvu pojedinih centara te dostupnosti same metode transplantacije koštane srži (23). Transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica treba svakako razmotriti i kod pacijenata rezistentnih na terapiju G-CSF-om čak i u odsustvu infekcije i maligne transformacije u MDS ili AML. Rezistentnost na terapiju G-CSF-om se definira kao izostanak normalizacije u broju neutrofila unatoč primjeni G-CSF-a u dozi $> 20 \mu\text{g/kg}$ dnevno, tijekom perioda dužeg od jednog mjeseca (106,108,109). Također, čini se da bi HSCT mogla biti prikladna i za neutropenične pacijente kronično ovisne o visokim dozama G-CSF-a (najmanje $10 \mu\text{g/kg}$ dnevno u trajanju minimalno 3 mjeseca godišnje) s obzirom na još nedokazan, povećan rizik od maligne transformacije pri većoj izloženosti G-CSF-u (106,110).

5.6.3. Ostale terapijske opcije

Pacijenti s WHIM sindromom uzrokovanim mutacijom CXCR4 gena ne pokazuju uvijek dobar odgovor na terapiju G-CSF-om. Potencijalna alternativna terapijska opcija kod tih pacijenata su lijekovi koji djeluju kao CXCR4 inhibitori. Kod pacijenata liječenih lijekom *plerixafor* uočeno je ublažavanje leukopenije, anemije, trombocitopenije i mijelofibroze. Nadalje, zabilježeno je smanjenje učestalosti infekcija te pojavnosti bradavica, stabilizacija planocelularnog orofaringealnog karcinoma vezanog uz HPV i značajno poboljšanje kvalitete života (111). Potencijalna alternativna terapijska opcija za liječenje kongenitalnih neutropenija uzrokovanih mutacijama gena ELANE je *ex vivo* CRISPR/Cas9 metoda nokautiranja ELANE gena pacijentovih hematopoetskih matičnih i progenitorskih stanica praćena autolognom transplantacijom koštane srži. Studija koja ju predlaže, temelji se na činjenici da je tzv. maturacijski arest odnosno nemogućnost progenitorskih stanica da formiraju zrele neutrofile, konzistentna značajka svih kongenitalnih neutropenija uzrokovanih ELANE mutacijom. Stoga, postoji pretpostavka da bi se ispravljanjem "maturacijskog aresta" CRISPR/Cas9-posredovanom metodom nokauta ELANE gena, mogle liječiti i neutropenije uzrokovane mutacijom gena ELANE (112). U posljednjih nekoliko godina objavljene su studije koje pokazuju učinkovitost SGLT2 inhibitora u liječenju kongenitalne neutropenije koja se javlja u sklopu glikogenoze tip 1b uzrokovane mutacijom SLC37A4 gena kao i teške kongenitalne neutropenije uzrokovane nedostatkom G6PC3. Radi se o lijekovima primarno namijenjenim liječenju dijabetesa tip 2 čiji je mehanizam djelovanja inhibicija bubrežnog natrij-glukoznog kotransportera (113,114). Nedavno je otkriveno da je nastanak neutropenije u navedenim entitetima uzrokovan nakupljanjem 1,5-anhidroglucitol-6-fosfata (1,5AG6P) u neutrofilima. Reapsorpcija ovog spoja odvija se u bubrežnim tubulima preko natrij ovisnog transportera iz SGLT-2 porodice. Primjena empagliflozina (SGLT-2 inhibitor) pokazala je sniženje razine 1,5-anhidroglucitol-6-fosfata (1,5AG6P) u neutrofilima kao i sniženje razine 1,5-anhidroglucitola (1,5AG) u plazmi pacijenata s glikogenozom tip 1b s nepotpunim odgovorom na terapiju G-CSF-om. Klinička je primjena empagliflozina rezultirala smanjenjem učestalosti infekcija i poboljšanjem mukoznih lezija i simptoma upalnih bolesti crijeva, a nije uočena ni pojava simptomatske hipoglikemije. Dokazana su i poboljšanja u neutrofilnoj funkciji (113).

5.6.4. Zbrinjavanje akutnih infekcija

U slučaju prve infektivne manifestacije pacijenata s još uvijek nespecificiranim tipom neutropenije, primjenjuje se antibiotik širokog spektra (neovisno o broju neutrofila) i G-CSF. Empirijsko antibiotsko liječenje potrebno je zamijeniti ciljanim nakon identifikacije uzročnika (23). Za pacijente s umjerenom neutropenijom kompliciranom površinskim ili infekcijama koje zahvaćaju uho, grlo ili nos s blago povišenim upalnim parametrima, dovoljna je oralna primjena antibiotika. Pacijenti s teškom neutropenijom i sepsom zahtijevaju hitnu hospitalizaciju. Pri hospitalizaciji važno je uzeti uzorke za bakteriološku analizu, učiniti RTG pluća i što prije započeti parenteralnu primjenu antibiotika. Ako nema poboljšanja unutar 48 h na datu empirijsku antibiotsku terapiju, potrebno je dodati i antifungalnu terapiju (5). U slučajevima u kojima je vrućica praćena bolom u abdomenu kao što se često može vidjeti kod cikličke neutropenije, važno je dodati i antibiotik učinkovit u borbi protiv anaerobnih uzročnika (11). Ako je stanje djeteta zabrinjavajuće od početka, potrebno je započeti terapiju G-CSF-om u standardnoj dozi od 5 µg/kg/dan ili onoj dozi na koju je pacijent prije reagirao (5).

5.6.5. Prevencija infekcija i antimikrobna profilaksa

Najučinkovitije metode u prevenciji infekcija su pranje ruku i primjena osnovnih higijenskih mjera. Iako velik broj obitelji nastoji sterilizirati životne prostore kako bi prevenirali razvoj infekcija kod neutropenične djece, većina metoda je neučinkovita budući da je glavni izvor infekcija kod ove djece njihova vlastita koža i crijevna flora. Virusni mogu oštetiti mukoznu barijeru i omogućiti lakši ulaz bakterija i posljedično razvoj sekundarnih bakterijskih infekcija. Stoga je preporučljivo izbjegavati gužve i bliski kontakt sa zaraženim pojedincima iako sama neutropenija ne utječe na sposobnost obrane od virusnih uzročnika. Kako bi se smanjila mogućnost infekcije gljivičnim uzročnikom, preporučljivo je izbjegavati mjesta koja mogu biti njihov potencijalan izvor (gradilišta, odlagališta ptičjih i životinjskih ostataka) (11). Podatci o učinkovitosti antibiotske profilakse kod pacijenata s kongenitalnim neutropenijama nisu dostupni, a primjena iste temelji se na standardima i praksi ustanove u kojoj se zbrinjavaju. Glavno načelo je da potencijalne prednosti antibiotske profilakse moraju nadilaziti rizik od generiranja bakterija rezistentnih na antibiotike (23). Idealna antimikrobna profilaksa trebala bi biti učinkovita protiv najčešćih patogena koji uzrokuju infekcije kod pojedinca, dobro tolerirana i ne bi trebala uzrokovati selekciju sojeva rezistentnih na antibiotike. Neki radovi preporučuju oralnu primjenu kombinacije sulfametoksazol/trimetoprim u dozi od 50 mg/kg dnevno za ovu indikaciju (5).

5.7. Transformacija u MDS/AML

Sindrome zatajenje koštane srži koji su definirani postojanjem deficijencije jedne ili više hematopoetskih loza, karakterizira povećan rizik za razvoj akutne mijeloične leukemije (AML) ili mijelodisplastičnog sindroma (MDS) (115). S obzirom na nezanemariv udio pacijenata koji razviju leukemiju, teške kongenitalne neutropenije trebale bi se smatrati preleukemijskih stanjem (13). Nakon uvođenja G-CSF-a kao standarda terapije teških kongenitalnih neutropenija, glavni uzrok mortaliteta postao je razvoj MDS/AML (115). Stopa pojavnosti hematoloških maligniteta kod pacijenata s kongenitalnom neutropenijom neovisno o genetičkom podtipu procjenjuje se na 10-60 %. To je znatno više u odnosu na opću populaciju u kojoj se pojavljuje kod 1 na 10 000 osoba (26). Francuski registar neutropenija (*engl. The French Neutropenia Registry*) objavio je kumulativnu incidenciju od 10.8 % za MDS/AML kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom u dobi od 20 godina (110). Druga prospektivna studija koja je uključivala 374 pacijenta iz Internacionalnog registra za teške kronične neutropenije (*engl. Severe Chronic Neutropenia International Registry*) na dugotrajnoj terapiji G-CSF-om pokazala je kumulativni rizik za razvoj MDS/AML od 22 % nakon 15 godina primjene G-CSF-a (41). Stopa leukemične transformacije uvelike ovisi o genetskom uzroku kongenitalne neutropenije. Procjenjuje se na 60 % u pacijenata s kongenitalnom neutropenijom uzrokovanom GATA2 mutacijama, 30 % kod pacijenata sa Shwachman-Diamond sindromom i 15 % kod pacijenata s ELANE mutacijama. Maligna transformacija je zabilježena i kod pacijenata s kongenitalnim neutropenijama uzrokovanim mutacijama u genima WAS, HAX1, G6PC3 i SLC37A4, a do sad nije zabilježena kod pacijenata s mutacijama u genima VPS13B i CXCR4 (26). Unatoč mutaciji u genu ELANE, pacijenti s cikličkom neutropenijom ne pokazuju povećan rizik za malignu transformaciju (116), ali postoje zabilježeni pojedinačni slučajevi pojave leukemične progresije i kod pacijenata s cikličkom neutropenijom (117). Pacijenti sa Shwachman-Diamond sindromom imaju povećan rizik za klonalnu hematopoezu od rane dobi zbog stjecanja mutacija u genima TP53 i EIF6. Razvoj leukemije povezan je uz stečene bialelične mutacije TP53 lokusa zbog delecije, gubitka heterozigotnosti ili točkaste mutacije (118). Pacijenti s kongenitalnom neutropenijom uzrokovanom mutacijama zametne linije u GATA2 genu

pokazuju učestalu pojavnost maligne transformacije (119). Kod ovih pacijenata, studije su pokazale i prisustvo nekih drugih somatskih mutacija kao što su STAG2, ASXL1 i DNMT3A koje dodatno utječu na smanjenje preživljenja i povećavaju rizik od progresije bolesti (120). Uvođenje metoda sekvenciranja sljedeće generacije, značajno je unaprijedilo naše spoznaje i saznanja o genomskim defektima povezanim s leukemičnom progresijom kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom (121). MDS/AML koji se razvijaju u sklopu kongenitalnih neutropenija, imaju različita molekularna obilježja u odnosu na *de novo* nastali MDS/AML (115,122). Sekundarni MDS/AML kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom često je povezan sa stečenim klonalnim citogenetičkim promjenama koje uključuju monosomiju kromosoma 7 i abnormalnosti kromosoma 21 (123). U studiji koja je provela ciljano sekvenciranje gena velike kohorte pacijenata s MDS/AML u sklopu TKN, zabilježena je mutacija gena CSF3R koji kodira za G-CSF receptor u 90 % slučajeva. Također, 63 % pacijenata je imalo mutaciju u genu RUNX1 (27). Monosomija kromosoma 7, CSF3R mutacija i RUNX1 mutacija nisu uobičajene u *de novo* nastalim MDS/AML (122,124).

5.7.1. CSF3R mutacija

Kod većine pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom i pojavom leukemične progresije, uočava se pojava hematopoetskih klonova sa somatskom mutacijom u genu CSF3R. Period od pojave prvih detektabilnih klonova s CSF3R mutacijom do pojave prvih znakova maligne transformacije je poprilično varijabilan. Kod nekih pacijenata klonovi perzistiraju mjesecima ili godinama prije pojave maligne transformacije. Stoga se može pretpostaviti da su za malignu transformaciju potrebni dodatni popratni događaji (124,125). Mutacije CSF3R gena su stečene u stadiju multipotentne progenitorske stanice. Većina mutacija CSF3R su besmislene mutacije koje uzrokuju skraćenje citoplazmatske domene G-CSF receptora u kojoj se nalazi regija bitna za indukciju sazrijevanja i inhibiciju rasta. Takvi mutirani receptori pokazuju pojačan proliferativni odgovor na stimulaciju G-CSF-om zbog poremećene internalizacije receptora. Posljedično dolazi do hiperproliferaciju uz nedostatak diferencijacije mijeloidnih stanica (38,126,127). Do klonalne hematopoeze dolazi zbog klonalnog širenja onih stanica koje

su stekle određene mutacije koje im daju prednost u odnosu na ostale stanice (115,128). CSF3R mutanti pokazuju produženo poluvrijeme života na citoplazmatskoj membrani te djeluju dominantno u odnosu na divlje tipove (129), a pojačani proliferativni odgovor djeluje na klonalnu ekspanziju hematopoetskih matičnih stanica s ovom mutacijom (130). Nakon otkrivanja mijeloidnih hematopoetskih klonova sa stečenom CSF3R somatskom mutacijom, postavilo se krucijalno pitanje o učinku terapije G-CSF-om u proliferaciji ovih klonova (13). Podatci iz dugogodišnjih studija u kojima su se pratili pacijenti s detektiranim CSF3R mutacijama na terapiji G-CSF-om, pokazuju da udio CSF3R mutiranih klonova nije rastao (27,124). Iako očito nije dovoljna za indukciju MDS/AML, postoje snažni dokazi da mutacija CSF3R pridonosi razvoju leukemogeneze. Transformacija u MDS/AML zahtijeva stjecanje dodatnih somatskih mutacija koje kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom uglavnom uključuju mutaciju RUNX1 i alteracije u kromosomu 7 (27).

5.7.2. RUNX1 mutacija

Somatske mutacije RUNX1 gena pronađene su u približno 10 % pacijenata s *de novo* nastalom AML, ali su ipak mnogo češće u sekundarnim formama MDS/AML (121). Mutacije gena RUNX1 do sad su najčešće pronađene somatske sekundarne mutacije kod bolesnika s MDS/AML u sklopu TKN i ponajprije se pojavljuju u CSF3R mutiranim klonovima. Ovaj obrazac je uočen kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom uzročno povezanom s mutacijama u genima ELANE, HAX1, SLC37A4, GF1 i WAS. Analize u stadijima prije razvoja leukemije, pokazale su da se RUNX1 mutacije pojavljuju kao kasni događaji u leukemičnoj transformaciji teških kongenitalnih neutropenija. Sekvencijska pojava CSF3R i RUNX1 mutiranih klonova, opisana je kao primjer jedinstvenog "kooperativnog modela" leukemogeneze u pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom (27). Ove forme sekundarnih MDS/AML karakterizira nepovoljna prognoza zbog refrakternosti na terapiju. Iako je neupitna uloga somatskih RUNX1 mutacija u sekundarnim formama MDS/AML, način na koji one pridonose patogenezi ovih stanja još je uvijek poprilično nejasan (121). Provedena je studija na miševima i modelima induciranih matičnih stanica (iPCS) u svrhu boljeg objašnjenja uloge

kombinacije RUNX1 mutacije i CSF3R mutacije u leukemičnoj progresiji. U njoj je pokazano da RUNX1 mutacije imaju ulogu u aktivaciji proliferativnih signalnih puteva s malim utjecajem na diferencijaciju. To dovodi do nakupljanja nezrelih stanica, ali ne i do apsolutnog diferencijacijskog bloka. Također, utvrđeno je da kombinacija ove dvije mutacije nije dovoljna za leukemičnu progresiju čak ni pri dugotrajnoj izloženosti G-CSF-u. Iznesena je i pretpostavka da bi sam upalni odgovor mogao biti važna dodatna sastavnica u razvoju mijeloidnog maligniteta u stanicama s RUNX1 mutacijom budući da je u svim modelima uočena pojačana aktivnost nekih upalnih citokina (121). Nedavno je opisana stečena mutacija CXXC4 gena koja smanjenjem ekspresije TET2 proteina potiče multiple upalne odgovore prepoznate kao potencijalan okidač za malignu transformaciju pacijenata s postojećim CSF3R/RUNX1 mutacijama (131). Ipak, složena interakcija i točna uzročno-posljedična veza između ovih mehanizama, ostaje predmetom daljnjih istraživanja (121).

5.8. Follow-up i prognoza

Kod djece s teškom kongenitalnom neutropenijom preporuča se temeljiti nadzor perifernih vrijednosti neutrofila barem triput godišnje kao i pregled koštane srži jednom godišnje (23). Potrebno je učiniti morfološki pregled koštane srži, citogenetske analize i somatsko sekvenciranje cijelog panela gena vezanih uz razvoj leukemije, ili minimalno sekvenciranje gena CSF3R, RUNX1 i TP53. To je važno kako bi se što prije prepoznale citogenetičke abnormalnosti, visokorizične somatske mutacije ili MDS prije razvoja leukemije (7). Činjenica da je dugotrajnost perzistiranja CSF3R mutiranih klonova prije razvoja maligne bolesti gotovo u potpunosti nepredvidiva, predstavlja problem pri odlučivanju o pravom trenutku djelovanja. Postavlja se pitanje kad je potrebno razmotriti prekidanje terapije G-CSF-om i eventualnu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica u svrhu pravovremene prevencije leukemične progresije (125). Otkriveno je da mutacije u genima kao što su RUNX1, SETBP1, ASXL1, TP53, PTPN11 zajedno s CSF3R mutacijama mogu biti snažni indikatori preleukemičnog stanja tijekom neutropenične faze kongenitalnih neutropenija. Stoga pacijenti s nekom od ovih dodatnih mutacija zahtijevaju detaljnije i učestalije praćenje (28). Godišnje sekvenciranje navedenih gena omogućava kontinuiran nadzor "ponašanja" klonova hematopoetskih matičnih stanica nositelja stečenih mutacija (7). Iako se uglavnom dobro podnosi, važno je nadzirati nastanak nuspojava kod pacijenata na dugoročnoj terapiji G-CSF-om. Neke od nuspojava liječenja G-CSF-om su trombocitopenija, glomerulonefritis, vaskulitis, splenomegalija i osteoporoza (5,23).

Prije uvođenja antibiotika, mortalitet od teških kongenitalnih neutropenija dosezao je 90 %. Nažalost, i nakon otkrića i uvođenja antibiotika u kliničku primjenu, više od 80 % pacijenata i dalje je umiralo od posljedica teških bakterijskih infekcija (132,133). Revolucija u liječenju teških kongenitalnih neutropenija nastala je otkrićem i početkom primjene rekombinantnog G-CSF-a (134). Njegovom primjenom drastično se promijenila kvaliteta života djece s teškom kongenitalnom neutropenijom, ali i njihovih obitelji. Značajno je smanjen rizik od nastanka teških infekcija, a posljedično i strah od umiranja zbog njihovih komplikacija. Većina djece s teškom kongenitalnom neutropenijom i

stabilnim vrijednostima ABN-a, neovisno o genetičkom uzroku neutropenije, danas doživi odraslu dob. Osim produljenja očekivanog trajanja života, većini djece je dostupnost terapije G-CSF-om omogućila sudjelovanje u normalnim životnim aktivnostima. Ukupno preživljenje od teških kongenitalnih neutropenija danas se procjenjuje na preko 80 %, uključujući pacijente koji su razvili malignitete. Približno 10 % pacijenata (uglavnom oni koji ne odgovaraju na terapiju G-CSF-om) još uvijek umire od sepse i ostalih posljedica teških kongenitalnih neutropenija. Preživljenje pacijenata s izoliranom neutropenijom bez ekstrapneuroloških manifestacija uglavnom ovisi o njihovom odgovoru na terapiju G-CSF-om. Preživljenje pacijenata čija se neutropenija pojavljuje uz zahvaćenost drugih sustava ovisi o težini neutropenije, ali i defektu drugih organa (13). Na primjer, kod Barthovog sindroma petogodišnje preživljenje iznosi približno 51 % i u znatnoj mjeri ovisi o težini srčanog zatajenja i mogućnosti transplantacije srca (55). Unatoč činjenici da primjena G-CSF-a može održavati vrijednost neutrofila na normalnoj ili gotovo normalnoj razini, mnogi pacijenti i dalje mogu imati neke infekcije. Osobito se ističu gingivitisi i parodontitisi. Zubno-gingivalna barijera ključna je za sprječavanje penetracije bakterija ispod razine cakline. Jednom oštećen, integritet te barijere se uglavnom rijetko oporavlja pa bolesti parodonta koje nastanu, mogu perzistirati doživotno. Stoga je redovita stomatološka skrb izuzetno važna kod zbrinjavanja neutropeničnih pacijenata. Najčešći uzrok neuspjeha u liječenju je nedostatak suradljivosti pacijenta. Postojanje povećanog rizika za razvoj hematološkog maligniteta kod pacijenata s teškom kongenitalnom neutropenijom može negativno utjecati na kvalitetu pacijentova života (13). Ipak, sve pristupačnije genetsko testiranje omogućuje lakše otkrivanje somatskih mutacija prediktora maligne transformacije. Nadu ulijeva i smanjenje smrtnosti vezane uz transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica i poboljšanje ishoda pacijenata (135).

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Ernestu Biliću na trudu, stručnosti i širokom znanju koje je nesebično dijelio sa mnom tijekom pisanja diplomskog rada i cjelokupnog boravka na Klinici. Posebnost Vašeg odjela zapalila je u meni iskru za pedijatriju.

Hvala mojim glazbenicima, hhhhh-ovcima i svim dragim prijateljima na razgovorima, druženjima, šalama i utjehama.

Hvala Susida na nezaboravnim danima na Savi i svim trenutcima kojima smo prkosile teškom vremenu pandemije. Hvala Cimi na najljepšem cimerstvu mog života i jednom velikom prijateljstvu koje je počelo na našoj dragoj Lašćini. Pokazale ste mi da i studentski dom može postati Dom ako ga dijelite s pravim ljudima.

Hvala Glore na svakoj molitvi, što si me čuvala i hrabrila iz daljine. Iako nas je život fizički razdvojio, uvijek ćeš ostati moja posebna osoba.

Hvala Franka što si me prepoznala i podupirala, ovo je jedini način da ti se bar pokušam odužiti.

Hvala mojoj obitelji i rodbini koji su se radovali svakom mom uspjehu i bili potpora u svakom smislu. Vaš trud je prepoznat.

Hvala mojoj majci. Hvala Ti što si bila najveći uzor i sigurna luka cijelog mog života. Hvala mom bratu. Hvala Ti na brizi, ljubavi i svim ulogama koje si preuzeo da mi nikad ništa ne fali. Moja zahvalnost Vama daleko prelazi opsege ovog teksta.

Hvala mom dečku Luki koji je vjerovao u mene u svakom trenutku. Hvala na svakom savjetu i utjehi. Ispunio si moje studiranje radošću i dao mu potpuno drugu dimenziju. Uz tebe sam odrasla.

Hvala svima koji su bar na trenutak bili dio ovog putovanja. Svaki od vas odigrao je dio uloge u izgradnji osobe kojom sam postala. Neizmjerno sam zahvalna Onome koji mi vas je providio i stavio na put. Koji me vodio i snažio kad svojim ljudskim očima nisam vidjela.

Ovaj rad posvećujem svojem tati i srcu dragim osobama koje su tijekom mog obrazovnog i životnog puta napustile ovaj svijet. Znam da me niste prestali motriti i nadam se da ste ponosni na osobu kojom sam postala.

7. LITERATURA

1. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018 Feb 7;82(1):e00057-17. doi: 10.1128/mnbr.00057-17
2. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007 Aug 1;28(8):340–5. doi: 10.1016/j.it.2007.06.002
3. C. Wayne Smith. Structure and Composition of Neutrophils, Eosinophils, and Basophils. In: *Williams Hematology. Ninth Edition.* New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 925.-937.
4. C. Wayne Smith. Production, Distribution, and Fate of Neutrophils. In: *Williams Hematology. Ninth Edition.* New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 939.-945.
5. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 May 19;6(1):26. doi: 10.1186/1750-1172-6-26
6. Li Y, Karlin A, Loike JD, Silverstein SC. Determination of the Critical Concentration of Neutrophils Required to Block Bacterial Growth in Tissues. *J Exp Med.* 2004 Sep 7;200(5):613–22. doi: 10.1084/jem.20040725
7. Fioredda F, Skokowa J, Tamary H, Spanoudakis M, Farruggia P, Almeida A, et al. The European Guidelines on Diagnosis and Management of Neutropenia in Adults and Children: A Consensus Between the European Hematology Association and the EuNet-INNOCHRON COST Action. *HemaSphere.* 2023 Mar 30;7(4):e872. doi: 10.1097/HS9.0000000000000872
8. Palmblad J, Höglund P. Ethnic benign neutropenia: A phenomenon finds an explanation. *Pediatr Blood Cancer.* 2018 Dec;65(12):e27361. doi: 10.1002/pbc.27361

9. Thobakgale CF, Ndung'u T. Neutrophil counts in persons of African origin. *Curr Opin Hematol*. 2014 Jan;21(1):50–7. doi: 10.1097/MOH.0000000000000007
10. Denic S, Narchi H, Al Mekaini LA, Al-Hammadi S, Al Jabri ON, Souid AK. Prevalence of neutropenia in children by nationality. *BMC Hematol*. 2016 May 21;16(1):15. doi: 10.1186/s12878-016-0054-8
11. Newburger PE, Dale DC. Evaluation and management of patients with isolated neutropenia. *Semin Hematol*. 2013 Jul;50(3):198–206. doi: 10.1053/j.seminhematol.2013.06.010
12. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol*. 2003 Feb;72(2):82–93. doi: 10.1002/ajh.10255
13. Skokowa J, Dale DC, Touw IP, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 Jun 8;3(1):1–18. doi: 10.1038/nrdp.2017.32
14. Dale DC. How I diagnose and treat neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2016 Jan;23(1):1. doi: 10.1097/MOH.0000000000000208
15. Dale DC. How I manage children with neutropenia. *Br J Haematol*. 2017 Aug;178(3):351–63. doi: 10.1111/bjh.14677
16. Zergham AS, Acharya U, Mukkamalla SKR. Cyclic Neutropenia. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Mar 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557396/>
17. Dale DC, Bolyard AA, Aprikyan A. Cyclic neutropenia. *Semin Hematol*. 2002 Apr 1;39(2):89–94. doi: 10.1053/shem.2002.31917
18. Curtis BR. Non-chemotherapy drug-induced neutropenia: key points to manage the challenges. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):187–93. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.187

19. Palmblad J, Nilsson CC, Höglund P, Papadaki HA. How we diagnose and treat neutropenia in adults. *Expert Rev Hematol*. 2016 May;9(5):479–87. doi: 10.1586/17474086.2016.1142867
20. Kostmann R. Infantile Genetic Agranulocytosis (Agranulocytosis infantilis hereditaria) A New Recessive Lethal Disease in Man. *Acta Paediatr*. 1956;45(3):309–10. doi: 10.1111/j.1651-2227.1956.tb06875.x
21. Furutani E, Newburger PE, Shimamura A. Neutropenia in the age of genetic testing: Advances and challenges. *Am J Hematol*. 2019 Mar;94(3):384–93. doi: 10.1002/ajh.25374
22. Newburger PE, Pindyck TN, Zhu Z, Bolyard AA, Aprikyan AAG, Dale DC, et al. Cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia in patients with a shared ELANE mutation and paternal haplotype: evidence for phenotype determination by modifying genes. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Aug;55(2):314–7. doi: 10.1002/pbc.22537
23. Fioredda F, Onofrillo D, Farruggia P, Barone A, Veltroni M, Notarangelo LD, et al. Diagnosis and management of neutropenia in children: The approach of the Study Group on Neutropenia and Marrow Failure Syndromes of the Pediatric Italian Hemato-Oncology Association (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica - AIEOP). *Pediatr Blood Cancer*. 2022 Jun;69(6):e29599. doi: 10.1002/pbc.29599
24. Dobrewa W, Madzio J, Babol-Pokora K, Lopacz P, Gierszon A, Guz K, et al. A high prevalence of neutrophil-specific antibodies in ELANE-mutated severe congenital neutropenia. *Pediatr Blood Cancer*. 2023 Apr;70(4):e30247. doi: 10.1002/pbc.30247
25. Corey SJ, Oyarbide U. New monogenic disorders identify more pathways to neutropenia: from the clinic to next-generation sequencing. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):172–80. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.172
26. Donadieu J, Beaupain B, Fenneteau O, Bellanné-Chantelot C. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, diagnosis, and natural history. *Br J Haematol*. 2017;179(4):557–74. doi: 10.1111/bjh.14887

27. Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE, Zeidler C, Klimenkova O, Klimiankou M, et al. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia: a unique pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2014 Apr 3;123(14):2229–37. doi: 10.1182/blood-2013-11-538025
28. Klimiankou M, Kandabarau S, Zeidler C, Steiert I, Pogozykh D, Dale DC, et al. Accumulation of Specific Somatic Leukemia-Associated Mutations in Congenital Neutropenia Precedes Malignant Transformation - New Preconditions for Treatment Decisions. *Blood*. 2022 Nov 15;140(Supplement 1):994–5. doi: 10.1182/blood-2022-158914
29. Makaryan V, Kelley ML, Fletcher B, Bolyard AA, Aprikyan AA, Dale DC. Elastase inhibitors as potential therapies for ELANE-associated neutropenia. *J Leukoc Biol*. 2017 Oct;102(4):1143–51. doi: 10.1189/jlb.5A1016-445R
30. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi KL, Shao J, Koboldt D, Miller CA, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2484–90. doi: 10.1182/blood-2015-04-641100
31. Lucas F, Michaels PD, Wang D, Kim AS. Mutational analysis of hematologic neoplasms in 164 paired peripheral blood and bone marrow samples by next-generation sequencing. *Blood Adv*. 2020 Sep 22;4(18):4362–5. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002306
32. Atallah-Yunes SA, Ready A, Newburger PE. Benign Ethnic Neutropenia. *Blood Rev*. 2019 Sep;37:S0268-960X(19)30024-4. doi: 10.1016/j.blre.2019.06.003
33. Fragiadaki I, Papadakis S, Sevastaki G, Sfyridaki K, Mavroudi I, Goulielmos GN, et al. Increased frequency of the single nucleotide polymorphism of the DARC/ACKR1 gene associated with ethnic neutropenia in a cohort of European patients with chronic idiopathic neutropenia. *Am J Hematol*. 2020 Jul;95(7):E163–6. doi: 10.1002/ajh.25813
34. Fioredda F, Rotulo GA, Farruggia P, Dagliano F, Pillon M, Trizzino A, et al. Late-onset and long-lasting autoimmune neutropenia: an analysis from the Italian

Neutropenia Registry. *Blood Adv.* 2020 Nov 18;4(22):5644–9. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002793

35. Newburger PE. Autoimmune and other acquired neutropenias. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):38–42. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.38

36. Fioredda F, Dufour C, Höglund P, Papadaki HA, Palmblad J. Autoimmune Neutropenias: Update on Clinical and Biological Features in Children and Adults. *HemaSphere.* 2022 Dec 19;7(1):e814. doi: 10.1097/HS9.0000000000000814

37. Lorenzo-Villalba N, Alonso-Ortiz MB, Maouche Y, Zulfiqar AA, Andrès E. Idiosyncratic Drug-Induced Neutropenia and Agranulocytosis in Elderly Patients. *J Clin Med.* 2020 Jun 10;9(6):1808. doi: 10.3390/jcm9061808

38. Dobrewa W, Bielska M, Bąbol-Pokora K, Janczar S, Młynarski W. Congenital neutropenia: From lab bench to clinic bedside and back. *Mutat Res Mutat Res.* 2024 Jan 1;793:108476. doi: 10.1016/j.mrrev.2023.108476

39. Touw IP. Congenital neutropenia: disease models guiding new treatment strategies. *Curr Opin Hematol.* 2022 Jan;29(1):27. doi: 10.1097/MOH.0000000000000696

40. Welte K, Zeidler C, Dale DC. Severe congenital neutropenia. *Semin Hematol.* 2006 Jul;43(3):189–95. doi: 10.1053/j.seminhematol.2006.04.004

41. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol.* 2010 Jul;150(2):196–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08216.x

42. Dale DC, Link DC. The Many Causes of Severe Congenital Neutropenia. *N Engl J Med.* 2009 Jan 1;360(1):3–5. doi: 10.1056/NEJMp0806821

43. Venugopal P, Gagliardi L, Forsyth C, Feng J, Phillips K, Babic M, et al. Two monogenic disorders masquerading as one: severe congenital neutropenia with

monocytosis and non-syndromic sensorineural hearing loss. *BMC Med Genet*. 2020 Feb 17;21(1):35. doi: 10.1186/s12881-020-0971-z

44. Warren JT, Cupo RR, Wattanasirakul P, Spencer DH, Locke AE, Makaryan V, et al. Heterozygous variants of CLPB are a cause of severe congenital neutropenia. *Blood*. 2022 Feb 3;139(5):779–91. doi: 10.1182/blood.2021010762

45. Bellanné-Chantelot C, Schmaltz-Panneau B, Marty C, Fenneteau O, Callebaut I, Clauin S, et al. Mutations in the SRP54 gene cause severe congenital neutropenia as well as Shwachman-Diamond-like syndrome. *Blood*. 2018 Sep 20;132(12):1318–31. doi: 10.1182/blood-2017-12-820308

46. Lebel A, Yacobovich J, Krasnov T, Koren A, Levin C, Kaplinsky C, et al. Genetic analysis and clinical picture of severe congenital neutropenia in Israel. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Jan;62(1):103–8. doi: 10.1002/pbc.25251

47. Palmer SE, Stephens K, Dale DC. Genetics, phenotype, and natural history of autosomal dominant cyclic hematopoiesis. *Am J Med Genet*. 1996 Dec 30;66(4):413–22. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19961230)66:4<413::AID-AJMG5>3.0.CO;2-L

48. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet*. 1999 Dec;23(4):433–6. doi: 10.1038/70544

49. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2317–22. doi: 10.1182/blood.V96.7.2317

50. Boxer LA. How to approach neutropenia. *Hematology*. 2012 Dec 8;2012(1):174–82. doi: 10.1182/asheducation.V2012.1.174.3798251

51. Hauet Q, Beaupain B, Micheau M, Blayo M, Gandemer V, Gottrand F, et al. Cardiomyopathies and congenital heart diseases in Shwachman–Diamond syndrome: A national survey. *Int J Cardiol*. 2013 Aug 10;167(3):1048–50. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.10.084

52. Badolato R, Dotta L, Tassone L, Amendola G, Porta F, Locatelli F, et al. Tetralogy of Fallot is an Uncommon Manifestation of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis Syndrome. *J Pediatr*. 2012 Oct 1;161(4):763–5. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.05.058
53. Abdollahpour H, Appaswamy G, Kotlarz D, Diestelhorst J, Beier R, Schäffer AA, et al. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3450–7. doi: 10.1182/blood-2011-09-378158
54. Desplantes C, Fremond ML, Beaupain B, Harousseau JL, Buzyn A, Pellier I, et al. Clinical spectrum and long-term follow-up of 14 cases with G6PC3 mutations from the French severe congenital neutropenia registry. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Dec 10;9(1):183. doi: 10.1186/s13023-014-0183-8
55. Rigaud C, Lebre AS, Touraine R, Beaupain B, Ottolenghi C, Chabli A, et al. Natural history of Barth syndrome: a national cohort study of 22 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 May 8;8(1):70. doi: 10.1186/1750-1172-8-70
56. Roques G, Munzer M, Barthez MAC, Beaufils S, Beaupain B, Flood T, et al. Neurological findings and genetic alterations in patients with Kostmann syndrome and HAX1 mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(6):1041–8. doi: 10.1002/pbc.24964
57. Kerr EN, Ellis L, Dupuis A, Rommens JM, Durie PR. The Behavioral Phenotype of School-Age Children with Shwachman Diamond Syndrome Indicates Neurocognitive Dysfunction with Loss of Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome Gene Function. *J Pediatr*. 2010 Mar 1;156(3):433-438.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.09.026
58. Kivitie-Kallio S, Larsen A, Kajasto K, Norio R. Neurological and psychological findings in patients with Cohen syndrome: a study of 18 patients aged 11 months to 57 years. *Neuropediatrics*. 1999 Aug;30(4):181–9. doi: 10.1055/s-2007-973488
59. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beaufils S, Bellanger F, Mahlaoui N, et al. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica*. 2012 Sep;97(9):1312–9. doi: 10.3324/haematol.2011.057489

60. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, Cassinat B, Rodrigues-Lima F, Beauvils S, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4119–25. doi: 10.1182/blood-2003-10-3518
61. Makaryan V, Zeidler C, Bolyard AA, Skokowa J, Rodger E, Kelley ML, et al. The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2015 Jan;22(1):3. doi: 10.1097/MOH.0000000000000105
62. Germeshausen M, Deerberg S, Peter Y, Reimer C, Kratz CP, Ballmaier M. The spectrum of ELANE mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia. *Hum Mutat*. 2013 Jun;34(6):905–14. doi: 10.1002/humu.22308
63. Dale DC, Hammond WP. Cyclic neutropenia: a clinical review. *Blood Rev*. 1988 Sep;2(3):178–85. doi: 10.1016/0268-960x(88)90023-9
64. Dale DC, Mackey MC. Understanding, Treating and Avoiding Hematological Disease: Better Medicine Through Mathematics? *Bull Math Biol*. 2015 May 1;77(5):739–57. doi: 10.1007/s11538-014-9995-x
65. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Occurrence of periodic oscillations in the differential blood counts of congenital, idiopathic, and cyclical neutropenic patients before and during treatment with G-CSF. *Exp Hematol*. 1999 Mar 1;27(3):401–9. doi: 10.1016/S0301-472X(98)00061-7
66. Hammond William P., Price Thomas H., Souza Lawrence M., Dale David C. Treatment of Cyclic Neutropenia with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *N Engl J Med*. 1989 May 18;320(20):1306–11. doi: 10.1056/NEJM198905183202003
67. Pham CTN. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):541–50. doi: 10.1038/nri1841
68. Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, Xia J, Boxer LA, Dale D, et al. Mutations of the *ELA2* gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded

protein response and cellular apoptosis. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4179–87. doi: 10.1182/blood-2006-11-057299

69. Köllner I, Sodeik B, Schreek S, Heyn H, von Neuhoff N, Germeshausen M, et al. Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):493–500. doi: 10.1182/blood-2005-11-4689

70. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519–29. doi: 10.1038/nrm2199

71. Olofsen PA, Bosch DA, Roovers O, van Strien PMH, de Looper HWJ, Hoogenboezem RM, et al. PML-controlled responses in severe congenital neutropenia with *ELANE*-misfolding mutations. *Blood Adv*. 2021 Feb 9;5(3):775–86. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003214

72. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schäffer AA, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):86–92. doi: 10.1038/ng1940

73. Germeshausen M, Grudzien M, Zeidler C, Abdollahpour H, Yetgin S, Rezaei N, et al. Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood*. 2008 May 15;111(10):4954–7. doi: 10.1182/blood-2007-11-120667

74. Pogozykh D, Yilmaz Karapinar D, Klimiankou M, Gerschmann N, Ebetsberger-Dachs G, Palmblad J, et al. HAX1-related congenital neutropenia: Long-term observation in paediatric and adult patients enrolled in the European branch of the Severe Chronic Neutropenia International Registry (SCNIR). *Br J Haematol*. 2023;202(2):393–411. doi: 10.1111/bjh.18840

75. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):481–90. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00116-8

76. Fan Y, Murgia M, Linder MI, Mizoguchi Y, Wang C, Łyszkiewicz M, Ziętara N, Liu Y, Frenz S, Sciuccati G, Partida-Gaytan A, Alizadeh Z, Rezaei N, Rehling P, Dennerlein S, Mann M, Klein C. HAX1-dependent control of mitochondrial proteostasis governs neutrophil granulocyte differentiation. *J Clin Invest.* 2022 May 2;132(9):e153153. doi: 10.1172/JCI153153
77. Skokowa J, Welte K. Defective G-CSFR signaling pathways in congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013 Feb;27(1):75–88, viii. doi: 10.1016/j.hoc.2012.11.001
78. Skokowa J, Klimiankou M, Klimenkova O, Lan D, Gupta K, Hussein K, et al. Interactions among HCLS1, HAX1 and LEF-1 proteins are essential for G-CSF–triggered granulopoiesis. *Nat Med.* 2012 Oct;18(10):1550–9. doi: 10.1038/nm.2958
79. Barth PG, Wanders RJA, Vreken P, Janssen E a. M, Lam J, Baas F. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome) (MIM 302060). *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(4):555–67. doi: 10.1023/A:1005568609936
80. Bione S, D’Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet.* 1996 Apr;12(4):385–9. doi: 10.1038/ng0496-385
81. Makaryan V, Kulik W, Vaz FM, Allen C, Dror Y, Dale DC, et al. The cellular and molecular mechanisms for neutropenia in Barth syndrome. *Eur J Haematol.* 2012;88(3):195–209. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01725.x
82. De Filippo K, Rankin SM. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(S2):e12949. doi: 10.1111/eci.12949
83. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003 May;34(1):70–4. doi: 10.1038/ng1149

84. Dale DC, Dick E, Kelley M, Makaryan V, Connelly J, Bolyard AA. Family studies of warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2020 Jan;27(1):11–7. doi: 10.1097/MOH.0000000000000554
85. Marin-Esteban V, Youn J, Beaupain B, Jaracz-Ros A, Barlogis V, Fenneteau O, et al. Biallelic CXCR2 loss-of-function mutations define a distinct congenital neutropenia entity. *Haematologica*. 2022;107(3):765–9. doi: 10.3324/haematol.2021.279254
86. Beaudet AL, Anderson DC, Michels VV, Arion WJ, Lange AJ. Neutropenia and impaired neutrophil migration in type IB glycogen storage disease. *J Pediatr*. 1980;97(6):906–10. doi: 10.1016/S0022-3476(80)80418-5
87. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, et al. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I. *J Pediatr*. 2000 Aug 1;137(2):187–91. doi: 10.1067/mpd.2000.105232
88. Carlin MP, Scherrer DZ, Tommaso AMAD, Bertuzzo CS, Steiner CE. Determining mutations in G6PC and SLC37A4 genes in a sample of Brazilian patients with glycogen storage disease types Ia and Ib. *Genet Mol Biol*. 2013;36:502–6. doi: 10.1590/S1415-47572013000400007
89. Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2843–53. doi: 10.1182/blood-2013-05-502435
90. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I Glycogen Storage Diseases: Disorders of the Glucose-6- Phosphatase Complex. *Curr Mol Med*. 2(2):121–43. doi: 10.2174/1566524024605798
91. Alsultan A, Sokol RJ, Lovell MA, Thurman G, Ambruso DR. Long term G-CSF-induced remission of ulcerative colitis-like inflammatory bowel disease in a patient with glycogen storage disease Ib and evaluation of associated neutrophil function. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(7):1410–3. doi: 10.1002/pbc.22706

92. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achouri Y, Collet JF, Van Schaftingen E. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib1. *FEBS Lett.* 1997;419(2–3):235–8. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01463-4
93. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. Inactivation of the Glucose 6-Phosphate Transporter Causes Glycogen Storage Disease Type 1b *. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26;274(9):5532–6. doi: 10.1074/jbc.274.9.5532
94. Chen SY, Pan CJ, Nandigama K, Mansfield BC, Ambudkar SV, Chou JY. The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic. *FASEB J.* 2008;22(7):2206–13. doi: 10.1096/fj.07-104851
95. Sim SW, Weinstein DA, Lee YM, Jun HS. Glycogen storage disease type Ib: role of glucose-6-phosphate transporter in cell metabolism and function. *FEBS Lett.* 2020 Jan;594(1):3–18. doi: 10.1002/1873-3468.13666
96. Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):47098–103. doi: 10.1074/jbc.M309472200
97. Calderwood S, Kilpatrick L, Douglas SD, Freedman M, Smith-Whitley K, Rolland M, Kurtzberg J. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for patients with neutropenia and/or neutrophil dysfunction secondary to glycogen storage disease type 1b. *Blood.* 2001 Jan 15;97(2):376-82. doi: 10.1182/blood.v97.2.376
98. Ambruso DR, McCabe ER, Anderson D, Beaudet A, Ballas LM, Brandt IK, Brown B, Coleman R, Dunger DB, Falletta JM, et al. Infectious and bleeding complications in patients with glycogenosis Ib. *Am J Dis Child.* 1985 Jul;139(7):691-7. doi: 10.1001/archpedi.1985.02140090053027
99. Spiekermann K, Roesler J, Emmendoerffer A, Elsner J, Welte K. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia.* 1997 Apr;11(4):466-78. doi: 10.1038/sj.leu.2400607

100. Welte K, Gabrilove J, Bronchud M, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*. 1996 Oct 1;88:1907–29. doi: 10.1182/blood.V88.6.1907.bloodjournal8861907
101. Fioredda F, Calvillo M, Bonanomi S, Coliva T, Tucci F, Farruggia P, et al. Congenital and acquired neutropenias consensus guidelines on therapy and follow-up in childhood from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Am J Hematol*. 2012;87(2):238–43. doi: 10.1002/ajh.22242
102. Molineux G, Kinstler O, Briddell B, Hartley C, McElroy P, Kerzic P, et al. A new form of Filgrastim with sustained duration in vivo and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans. *Exp Hematol*. 1999 Dec 1;27(12):1724–34. doi: 10.1016/S0301-472X(99)00112-5
103. Fioredda F, Lanza T, Gallicola F, Riccardi F, Lanciotti M, Mastrodicasa E, et al. Long-term use of pegfilgrastim in children with severe congenital neutropenia: clinical and pharmacokinetic data. *Blood*. 2016 Oct 27;128(17):2178–81. doi: 10.1182/blood-2016-07-727891
104. Allen RC, Stevens PR, Price TH, Chatta GS, Dale DC. In Vivo Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Oxidative Functions in Normal Human Volunteers. *J Infect Dis*. 1997 May 1;175(5):1184–92. doi: 10.1086/595866
105. Jayabose S, Tugal O, Sandoval C, Li K. Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor in Cyclic Neutropenia: Use of a New 3-Day-a-Week Regimen. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1994 Nov;16(4):338.
106. Peffault de Latour R, Peters C, Gibson B, Strahm B, Lankester A, de Heredia CD, et al. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Sep;50(9):1168–72. doi: 10.1038/bmt.2015.117

107. Fioredda F, Iacobelli S, van Biezen A, Gaspar B, Ancliff P, Donadieu J, et al. Stem cell transplantation in severe congenital neutropenia: an analysis from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2015 Oct 15;126(16):1885–92. doi: 10.1182/blood-2015-02-628859
108. Zeidler C, Welte K, Barak Y, Barriga F, Bolyard AA, Boxer L, et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1195–8. doi: 10.1182/blood.V95.4.1195.004k36_1195_1198
109. Ferry C, Ouachée M, Leblanc T, Michel G, Notz-Carrère A, Tabrizi R, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in severe congenital neutropenia: experience of the French SCN register. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jan;35(1):45–50. doi: 10.1038/sj.bmt.1704718
110. Donadieu J, Leblanc T, Meunier BB, Barkaoui M, Fenneteau O, Bertrand Y, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica*. 2005 Jan 1;90(1):45–53.
111. McDermott DH, Pastrana DV, Calvo KR, Pittaluga S, Velez D, Cho E, Liu Q, Trout HH 3rd, Neves JF, Gardner PJ, Bianchi DA, Blair EA, Landon EM, Silva SL, Buck CB, Murphy PM. Plerixafor for the Treatment of WHIM Syndrome. *N Engl J Med*. 2019 Jan 10;380(2):163-170. doi: 10.1056/NEJMoa1808575.
112. Nasri M, Ritter M, Mir P, Dannenmann B, Aghaallaei N, Amend D, et al. CRISPR/Cas9-mediated ELANE knockout enables neutrophilic maturation of primary hematopoietic stem and progenitor cells and induced pluripotent stem cells of severe congenital neutropenia patients. *Haematologica*. 2020 Mar;105(3):598–609. doi: 10.3324/haematol.2019.221804
113. Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TGJ, Chevalier N, Knight V, Koller A, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib

with an SGLT2 inhibitor. *Blood*. 2020 Aug 27;136(9):1033–43. doi: 10.3324/haematol.2019.221804

114. Boulanger C, Stephenne X, Diederich J, Mounkoro P, Chevalier N, Ferster A, et al. Successful use of empagliflozin to treat neutropenia in two G6PC3-deficient children: Impact of a mutation in SGLT5. *J Inherit Metab Dis*. 2022;45(4):759–68. doi: 10.1002/jimd.12509

115. Link DC. Mechanisms of leukemic transformation in congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2019 Jan;26(1):34. doi: 10.1097/MOH.0000000000000479

116. Zeidler C, Vandenberghe P, Schäfer I, Hoy L, Zimmermann M, Germeshausen M, et al. UPDATE On the RISK of SECONDARY LEUKEMIA In GENETIC SUBGROUPS (ELANE, HAX1, WAS, G6PC3, p14) of CONGENITAL NEUTROPENIA In EUROPE. *Blood*. 2011 Nov 18;118:1106–1106. doi: 10.1182/blood.V118.21.1106.1106

117. Klimiankou M, Mellor-Heineke S, Klimenkova O, Reinel E, Uenalan M, Kandabarau S, et al. Two cases of cyclic neutropenia with acquired CSF3R mutations, with 1 developing AML. *Blood*. 2016 May 26;127(21):2638–41. doi: 10.1182/blood-2015-12-685784

118. Kennedy AL, Myers KC, Bowman J, Gibson CJ, Camarda ND, Furutani E, et al. Distinct genetic pathways define pre-malignant versus compensatory clonal hematopoiesis in Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Commun*. 2021 Feb 26;12(1):1334. doi: 10.1038/s41467-021-21588-4

119. Donadieu J, Lamant M, Fieschi C, de Fontbrune FS, Caye A, Ouachee M, et al. Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. *Haematologica*. 2018 Aug;103(8):1278–87. doi: 10.3324/haematol.2017.181909

120. West RR, Calvo KR, Embree LJ, Wang W, Tuschong LM, Bauer TR Jr, et al. ASXL1 and STAG2 are common mutations in GATA2 deficiency patients with bone marrow disease and myelodysplastic syndrome. *Blood Adv*. 2022 Jan 31;6(3):793–807. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005065

121. Olofsen PA, Touw IP. RUNX1 Mutations in the Leukemic Progression of Severe Congenital Neutropenia. *Mol Cells*. 2020 Feb 29;43(2):139–44. doi: 10.14348/molcells.2020.0010
122. Link DC, Kunter G, Kasai Y, Zhao Y, Miner T, McLellan MD, et al. Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1648–55. doi: 10.1182/blood-2007-03-081216
123. Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, Bolyard AA, Scarlata D, Boxer LA, et al. Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):429–36.
124. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: results of a long-term survey. *Blood*. 2006 Sep 14;109(1):93–9. doi: 10.1182/blood-2006-02-004275
125. Touw IP. Game of clones: the genomic evolution of severe congenital neutropenia. *Hematology*. 2015 Dec 5;2015(1):1–7. doi: 10.1182/asheducation-2015.1.1
126. Hunter MG, Avalos BR. Deletion of a critical internalization domain in the G-CSFR in acute myelogenous leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):440–6.
127. Ward AC, van Aesch YM, Schelen AM, Touw IP. Defective internalization and sustained activation of truncated granulocyte colony-stimulating factor receptor found in severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):447–58.
128. Xia J, Miller CA, Baty J, Ramesh A, Jotte MRM, Fulton RS, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in congenital neutropenia. *Blood*. 2018 Jan 25;131(4):408–16. doi: 10.1182/blood-2017-08-801985
129. Dong Fan, Brynes Russell K., Tidow Nicola, Welte Karl, Löwenberg Bob, Touw Ivo P. Mutations in the Gene for the Granulocyte Colony-Stimulating–Factor Receptor in

Patients with Acute Myeloid Leukemia Preceded by Severe Congenital Neutropenia. *N Engl J Med.* 1995;333(8):487–93. doi: 10.1056/NEJM199508243330804

130. Liu F, Kunter G, Krem MM, Eades WC, Cain JA, Tomasson MH, et al. Csf3r mutations in mice confer a strong clonal HSC advantage via activation of Stat5. *J Clin Invest.* 2008 Mar;118(3):946–55. doi: 10.1172/JCI32704

131. Olofsen PA, Fatrai S, van Strien PMH, Obenauer JC, de Looper HWJ, Hoogenboezem RM, et al. Malignant Transformation Involving CXXC4 Mutations Identified in a Leukemic Progression Model of Severe Congenital Neutropenia. *Cell Rep Med.* 2020 Aug 25;1(5):100074. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100074

132. Chown G, Gelfand AS. AGRANULOCYTOSIS. *Can Med Assoc J.* 1933 Aug;29(2):128–34.

133. Gilman PA, Jackson DP, Guild HG. Congenital agranulocytosis: prolonged survival and terminal acute leukemia. *Blood.* 1970 Nov;36(5):576–85. doi: 10.1182/blood.V36.5.576.576

134. Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Effects on Normal and Leukemic Myeloid Cells. *Science.* 1986 Apr 4;232(4746):61–5. doi: 10.1126/science.2420009

135. Zeidler C, Nickel A, Sykora KW, Welte K. Improved Outcome Of Stem Cell Transplantation for Severe Chronic Neutropenia With Or without Secondary Leukemia: A Long-Term Analysis of European Data For More Than 25 Years By the SCNIR. *Blood.* 2013 Nov 15;122(21):3347. doi: 10.1182/blood.V122.21.3347.3347

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Maja Pučić

Rođena sam 8. siječnja 2000. godine u Šibeniku gdje sam provela svoje djetinjstvo i započela obrazovanje. Nakon završene Osnovne škole Vidici, srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u Gimnaziji Antuna Vrančića Šibenik, gdje sam 2018. godine završila opći smjer. Paralelno sam pohađala Glazbenu školu Ivana Lukačića u kojoj sam 2017. godine maturirala i stekla zvanje glazbenik violinist.

Od 2018. godine studiram medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja bila sam demonstrator na predmetu Klinička propedeutika u akademskoj godini 2022./2023., a u akademskoj godini 2023./2024. demonstrator iz predmeta Pedijatrija na Zavodu za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju.

Dodijeljena mi je Dekanova nagrada za uspjeh kao najboljoj studentici pete godine (ak.god. 2022./2023.) te dvije Posebne dekanove nagrade za izniman doprinos ugledu Medicinskog fakulteta - kao članici pjevačkog zbora "Lege artis" u ak.god. 2021./2022. i kao članici Studentske sekcije za gastroenterologiju i hepatologiju u ak.god. 2022./2023.

Tijekom studiranja sudjelovala sam kao autor i koautor na nekoliko prikaza slučajeva i radova čije sam sažetke prezentirala na kongresima i simpozijima. Aktivna sam članica Studentske sekcije za pedijatriju i Studentske sekcije za gastroenterologiju i hepatologiju unutar kojih sudjelujem u organizaciji različitih predavanja, radionica i edukacija. Pohađala sam nekoliko edukacijskih programa kao što su Ljetna škola otočne medicine i StEPP Trauma edukacija. Radila sam kao medicinsko osoblje na međunarodnom paraolimpijskom boćarskom turniru Zagreb 2022 World Boccia Challenger. Također, bila sam edukator na projektima "Pogled u sebe" za promicanje mentalnog zdravlja među srednjoškolskom populacijom i projektu "I nastavnici promiču zdravlje" namijenjenom studentima nastavničkih studija.

Povremeno volontiram u Specijalnoj bolnici za kronične bolesti dječje dobi Gornja Bistra i Bolnici za medvjediće u organizaciji EMSA Zagreb.

Nakon završenog Programa edukacije i podrške za volontiranje u zemljama izvan Europe u organizaciji Volonterske mreže Ante Gabrić, odlučila sam djelovati kao volonter i medicinska ispomoć na misiji Adea u Ugandi, od kolovoza do studenog ove godine.

Aktivno koristim engleski jezik u pismu i govoru te pasivno talijanski jezik. Na računalu imam vještine korištenja računalnih programa MS Office.

Svoju dugogodišnju ljubav prema glazbi negujem svirajući violinu u Komornom orkestru Sveučilišta u Zagrebu i Gradskom komornom orkestru Šibenik te kao članica Pjevačkog zbora Medicinskog fakulteta "Lege artis".