

Eksperimentalna upotreba čimbenika poticanja rasta granulocitnih kolonija (G-CSF) u kliničkoj praksi

Omerović, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:477484>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Alen Omerović

EKSPERIMENTALNA UPOTREBA ČIMBENIKA POTICANJA RASTA
GRANULOCITNIH KOLONIJA (G-CSF) U KLINIČKOJ PRAKSI

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Alen Omerović

EKSPERIMENTALNA UPOTREBA ČIMBENIKA POTICANJA RASTA
GRANULOCITNIH KOLONIJA (G-CSF) U KLINIČKOJ PRAKSI

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Duška Petranović, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ines Mrakovčić - Šutić, dr. med.
2. Izv. prof. dr. sc. Ingrid Belac - Lovasić, dr. med.
3. Izv. prof. dr. sc. Sanja Klobučar Majanović, dr. med.

Rad sadrži 34 stranice, 0 slika i 34 literaturna navoda.

POPIS SKRAĆENICA i AKRONIMA

^{99m}Tc SPECT – engl. Technetium-99m single-photon emission computerized tomography

Akt1 – engl. Protein kinase B

GCS-F– engl. Granulocyte-colony stimulating factor

IL-10– engl. Interleukin 10

IL-2– engl. Interleukin 2

IL-4 – engl. Interleukin 4

IL-5– engl. Interleukin 5

JAK2– engl. Janus kinase 2

JAK2/STAT3 – engl. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription

LPS– engl. Lipopolysaccharide

p-Akt1– engl. phosphorylated Protein kinase B

PI3k/Akt– engl. phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B

p-JAK2– engl. phosphorylated Janus kinase 2

p-STAT3– engl. phosphorylated Signal transducer and activator of transcription

STAT3– engl. signal transducer and activator of transcription

TNF- α – engl. tumor necrosis factor alpha

ZAHVALA

Hvala mami što mi je čitala lektire, hvala tati na bezuvjetnoj podršci, hvala sestrama na instrukcijama i hvala mentorici na usmjerenju.

Posvećeno mom rahmetli djedu Mehi, uspjeli smo.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. INFEKTIVNA STANJA BEZ NEUTROPENIJE.....	2
2.1. Animalni modeli	2
2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA	3
2.3. Klinička upotreba.....	3
2.3.1. Pneumonija	3
2.4. Učinkovitost.....	5
3. DIJABETIČKO STOPALO.....	5
3.1. Učinkovitost.....	6
4. ZATAJIVANJE SRCA.....	7
4.1 Animalni modeli.....	7
4.2 Mehanizam djelovanja	10
4.3 Kliničke studije.....	11
4.3.1 Slučajevi teškog kroničnog zatajivanja srca s implantabilnim kardioverter-defibrilatorom.....	11
4.3.2 Slučajevi teškog kroničnog zatajivanja srca s prijašnjim infarktom	12
4.3.3 Slučajevi teškog kroničnog zatajivanja srca s dilatativnom ili ishemijskom kardiomiopatijom.....	14
4.3.4 Učinkovitost	15
5. RASPRAVA.....	17
6. ZAKLJUČAK	20
7. SAŽETAK	21
8. SUMMARY	22
9. LITERATURA.....	23
10. ŽIVOTOPIS	28

1. UVOD

G-CSF je faktor rasta koji stimulira proliferaciju i maturaciju neutrofila te pospješuje njihov prelazak iz koštane srži u krv. Posreduje svoje učinke vezanjem na jedan homodimerni receptor, G-CSFR. Koncentracije G-CSF-a u plazmi obično su niske, ali brzo rastu kao odgovor na infekciju i nakon toga opadaju s oporavkom. Mnoga tkiva mogu proizvoditi G-CSF kada su prikladno stimulirana, uz pomoć medijatora upale kao što su lipopolisaharid, faktor tumorske nekroze , faktor rasta vaskularnog endotela, interleukin-17 i interleukin-1 koji induciraju ekspresiju u endotelnim stanicama, makrofagima, epitelnim stanicama i fibroblastima. Oslobođanje G-CSF u krvotok od strane tkiva stimulira proizvodnju neutrofila unutar koštane srži i mobilizaciju iz koštane srži. Nadalje, lokalno proizvedeni G-CSF unutar tkiva također utječe na funkciju neutrofila na mjestu infekcije. G-CSF može inhibirati apoptozu neutrofila, povećavajući preživljavanje unutar inficiranih tkiva.

Njegovo generičko ime je filgastrim i koristi se u kliničkoj praksi od 1991. godine. U kliničkoj praksi ima uske terapijske indikacije: febrilna neutropenija, pacijenti koji primaju mijeloablativnu terapiju prije presađivanja koštane srži, dodatak uz citotoksičnu kemoterapiju, kongenitalna neutropenija i perzistentna neutropenija u pacijenata oboljelih od HIV infekcije. Druge ekeperimentalne indikacije su razvijene na temelju animalnih modela u kojima je G-CSF pokazao pozitivan učinak.

2. INFEKTIVNA STANJA BEZ NEUTROPENIJE

2.1. Animalni modeli

G-CSF pospešuje maturaciju neutrofila koji igraju ključnu ulogu u antimikrobnom djelovanju, zato je predložen sinergistički model djelovanja antibiotika s G-CSF-om. Mnogi ne-neutropenijski animalni modeli infekcije su pokazali povoljan učinak G-CSF-a u suzbijanju infekcije i sepse.

Već 1990. godine prva studija na novorođenim štakorima demonstrira uspješnost G-CSF-a u modelu sepse (1). U odraslim štakorima, G-CSF je smanjio smrtnost od pneumonije uzrokovane gram-negativnim bakterijama, uključujući i *Klebsiella pneumoniae*, kod životinja koje su dobivale etanol kako bi se smanjila učinkovitost neutrofila i kod životinja koje su splenektomirane da bi postale osjetljivije na aerosolni test s pneumokokom (2,3,4). Slično, pokazalo se da je primjena G-CSF-a uspješna kao dodatak antimikrobnoj terapiji u liječenju infekcije uzrokovane *Pseudomonas aeruginosa* u modelu opekline, intramuskularne infekcije i hemoragičnog šoka (5,6). U psećem modelu, u kojem je ugrušak zaražen *Escherichia coli* postavljen intraperitonealno, pokazalo se da primjena G-CSF-a poboljšava preživljavanje i infekciju kardiovaskularnog sustava. U drugom modelu intraperitonealne infekcije, podvezivanjem cecalnog crijeva u štakora, pokazalo se da G-CSF povećava preživljenje više nego u skupini kontrolnih životinja (7).

Značaj ovih studija za ljude sugerira *ex vivo* studija stimuliranog oslobađanja proupalnih citokina i inhibitora protuupalnih citokina u krvi dobivenoj od zdravih dobrovoljaca koji su primili jednu ili dvije dnevne doze G-CSF ili placeba. Kod skupine koja je primila G-CSF smanjena je proizvodnja TNF-a iz leukocita u krvi kao odgovor na razne podražaje, uključujući bakterijski LPS, u usporedbi sa skupinom koja je primala placebo. Suprotno tome, otpuštanje topljivih TNF receptora i proteina antagonista IL-1 receptora pojačano je

primjenom G-CSF. Istraživači su zaključili da terapija G-CSF može potaknuti sistemski protuupalni odgovor tijekom infekcije ili drugih upalnih stanja (8). U drugom sličnom istraživanju, zdravi ispitanici su primili 4 ng/kg LPS-a, što je uzrokovalo groznicu i neutropeniju. Prethodni tretman s G-CSF-om povećao je broj neutrofila, kao i razine inhibitora LPS-a dobivenog iz neutrofila, proteina inhibitora propusnosti bakterija (9).

Podatci istraživanja ne-neutropeničnih životinjskih modela akutne bakterijske infekcije podržavaju zaštitnu ulogu G-CSF-a, za koju se temeljem dosadašnjih istraživanja pretpostavlja da ima učinke od uništavanja mikroorganizama do smanjenja regulacije nekih štetnih aspekata sistemskog upalnog odgovora. Studije učinaka G-CSF-a na primjenu endotoksina kod ljudi podržale su njegovu sigurnost, kao i njegovu sposobnost da blokira neke od učinaka LPS-a, vjerojatno kroz modifikaciju odgovora citokina.

2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA

Primjena G-CSF-a kod ne-neutropenične bakterijske infekcije temelji se na tri moguća mehanizma djelovanja: pojačana kemotaksija i aktivnost ubijanja bakterija(10); imunomodulacija citokinskog odgovora u sepsi i povećanje intracelularnog unosa antibiotika(11,12).

2.3. Klinička upotreba

2.3.1. Pneumonija

Velik udio smrtnosti uzrokovan upalom pluća povezan je sa sepsom, za koju se smatra da predstavlja stanje nekontrolirane upale. G-CSF može se koristiti kao dodatak antibioticima u liječenju bakterijske pneumonije u odraslih osoba bez neutropenije. Imunomodulacija ovog

odgovora, korištenjem fizioloških doza kortikosteroida i rekombinantnog aktiviranog proteina C, povezana je s poboljšanim ishodima(13,14).

Prva studija uključuje pacijente s vanbolničkom multilobarnom upalom pluća, budući da su prethodna ispitivanja sugerirala da bi ova skupina, prepoznata kao skupina s većim rizikom od smrtnosti, mogla imati koristi od G-CSF-a. Iako rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku smrtnosti, u podgrupi ispitanika oboljelih od pneumokokne pneumonije smrtnost je bila manja u odnosu na kontrolnu skupinu (15).

Sigurnosno testiranje provedeno je na malom broju pacijenata oboljelih od pneumonije sa znakovima sepse. Iako je ishod sepse multifaktorijalan, G-CSF je pokazao smanjenje broja bakterija u sputumu uz povećanje broja neutrofila (16).

Nakon sigurnosne analize prethodne studije, velika studija procijenila je učinak G-CSF-a u bolesnika s teškom sepsom i upalom pluća koji zahtijevaju prijem na intenzivnu njegu. Nisu isključeni bolesnici s neutropenijom i oni koji su primali kemoterapiju. U ovom istraživanju G-CSF se pokazao siguran bez značajnog utjecaja na smrtnost (17).

Studija G-CSF-a u bolesnika s teškom sepsom i pneumonijom zbog sumnje na melioidozu (tropska infekcija uzrokovana Burkholderiom pseudomallei) provedena je na Tajlandu. Od 60 uključenih pacijenata, njih 36 je imalo upalu pluća. G-CSF nije bio povezan s redukcijom mortaliteta u onih s melioidozom ili onih s upalom pluća. Primarna mjera ishoda bila je 28-dnevna smrtnost. Zbog kratkog preživljenja pacijenata u ovoj studiji, nuspojave se nisu mogle pripisati liječenju (18).

Bakterijska etiologija bila je slična u svim provedenim studijama, a najčešći uzročnik *Streptococcus pneumoniae*. U studijama pacijenata sa septičkim šokom, postojao je veći udio *Staphylococcus aureus* u usporedbi s *Haemophilus influenzae*, što odražava težu bolest koja prati infekciju *S. aureus*om.

2.4. Učinkovitost

Ova interpretacija rezultata sugerira da G-CSF može biti povezan s blagim smanjenjem mortaliteta, ali postoji znatna nesigurnost s rasponom ishoda od 48% smanjenja mortaliteta do 27% povećanja mortaliteta. Negativan ili nedefiniran ishod studija, u odnosu na animalne modele, može imati nekoliko razloga: loše postavljene hipoteze, neadekvatno doziranje, neprikladan dizajn studije ili neuspješna provedba.

3. DIJABETIČKO STOPALO

Infekcije stopala u osoba s dijabetesom teško se liječe, a terapijski neuspjeh često dovodi do amputacije donjih ekstremiteta (19). Gotovo sve inficirane lezije stopala zahtijevaju antibiotsku terapiju, ali prodor antibiotika do inficiranog mekog tkiva i kosti može biti neadekvatan uz rast rezistencije na antibiotike. Ove infekcije također mogu biti refraktorne na liječenje zbog neodgovarajućeg kirurškog debridmana, neoptimalne skrbi za ranu ili teške ishemije ekstremiteta. Nadalje, dijabetes je povezan s imunološkim nedostacima, uključujući abnormalnu kemotaksiju i fagocitozu neutrofila. Ovi čimbenici pomažu objasniti prijavljene stope kliničkog neuspjeha od 20% do 30% pri liječenju infekcija dijabetičkog stopala (20).

Kod osoba s dijabetesom u kliničkoj praksi korištene su dvije vrste faktora rasta: trombocitni faktori rasta i G-CSF. Međutim, ova dva čimbenika rasta su biološki različita i imaju vrlo različite kliničke uloge: G-CSF se koristi za liječenje infekcija, a trombocitni čimbenici rasta za zacjeljivanje rana. Iako su potencijalno povezani (inficirane rane obično ne zacjeljuju dok ne dođe do rezolucije infekcije, a otvorena rana je u opasnosti od infekcije), oni imaju različite patofiziološke puteve i imaju vrlo različite pristupe liječenju. Štoviše, G-CSF se obično ubrizgava (supkutano, intramuskularno ili intravenozno) i rijetko se primjenjuje lokalno, dok se faktori rasta dobiveni iz trombocita primjenjuju izravno na površinu rane.

Rezultati meta analize pet studija pokazali su da nema dokaza da liječenje G-CSF pomaže u liječenju infekcije ili poboljšanju cijeljenja ulkusa stopala u osoba s dijabetesom, međutim nedostaje veći broj ispitanika kako bi se procijenila korisnost terapije. U ovome istraživanju G-CSF je pokazao i druge pozitivne učinke. Nije iznenađujuće da je G-CSF povećao broj leukocita u svakoj od studija u kojima je to ispitivano. Što je još važnije, G-CSF terapija bila je povezana s velikim i statistički značajnim smanjenjem amputacije donjih ekstremiteta, kao i drugih kirurških intervencija povezanih s infekcijom stopala. Ovo su najozbiljnije i najskuplje posljedice infekcija dijabetičkog stopala te bi smanjenje tih događaja bilo od velike koristi i za pacijente i za zdravstveni sustav (21).

3.1. Učinkovitost

Patofiziologija, mikrobiologija i liječenje dijabetičkog stopala su složene (22). Iako ima nekoliko razloga povećane osjetljivosti na infekcije u osoba s dijabetesom, neodgovarajući odgovor neutrofila smatra se jednim od važnijih uzroka. G-CSF povećava oslobađanje neutrofila iz koštane srži i poboljšava funkcije neutrofila, no ipak najpozitivniji rezultati koji su uočeni u G-CSF studijama odnosili su se na smanjenje učestalosti amputacije i drugih kirurških intervencija, a ne na ishode vezane uz status infekcije, što sugerira da bi G-CSF bio prikladna intervencija u bolesnika s infekcijama kojima prijeti amputacija. Na mnoga pitanja o primjeni G-CSF-a u liječenju infekcije dijabetičkog stopala tek treba dati odgovor. Klinička heterogenost u ispitivanoj populaciji postavlja pitanje o tome koja podskupina bolesnika može imati najviše koristi od terapije G-CSF-om. S obzirom na nižu stopu amputacije, dostupni podaci podržavaju primjenu G-CSF-a koja je najprikladnija u bolesnika s infekcijama kojima prijeti amputacija. Međutim, buduće studije bi trebale dati specifične informacije o djelotvornosti G-CSF na temelju težine bolesti.

4. ZATAJIVANJE SRCA

4.1 Animalni modeli

Uzimajući u obzir proučavanje učinka G-CSF na mitohondrije kardiomiocita, provedena je studija na osam tjedana starim mužjacima miševa u kojima je doksorubicin ubrizgan 6 puta tijekom 2 tjedna, nakon čega je uslijedila primjena G-CSF tijekom 5 kontinuiranih dana. Terapijske doze doksorubicina izazivaju nepromjenjivu proširenu kardiomiopatiju praćenu nekrozom miokarda i teškim zatajenjem srca. Iako je ubrizgavanje blagih doza doksorubicina *in vivo* rezultiralo dezorganizacijom mitohondrija u kardiomiocitima i dijastoličkom disfunkcijom, tipične karakteristike kardiomiopatije nisu se pojavile. Ova studija je pokazala da se poboljšanje mitohondrijske funkcije kardiomiocita i hemodinamske funkcije srca može postići primjenom G-CSF-a osobito u ranoj fazi srčanog oštećenja (23).

Druga studija je provedena na 24 kunića koji su bolovali od zatajenja srca. Kunići su primali G-CSF 17 ± 4 dana. Terapija G-CSF-om utjecala je na arteriogenezu i angiogenezu što je dovelo do poboljšanja kontraktilnosti miokarda i usporilo razvoj disfunkcije lijevog ventrikula u kunića s neishemičnim zatajenjem srca. Suprotno tome, dugotrajno liječenje G-CSF-om dovelo je do povećane pojave ventrikularne tahiaritmije. Navedeno istraživanje naglašava kako odabir citokina u liječenju zatajenja srca zahtijeva precizno praćenje rada srca s ciljem prevencije repolarizacije miokarda (24).

U procjenu učinkovitosti G-CSF-a u kardiovaskularnim bolestima uzrokovanim prehranom s visokim udjelom masnoća povezanim s pretilošću i dijabetesom melitusom tipa 2 uključeni su 20 tjedana stari mužjaci kunića. Izazvana im je pretilost tako što su prehranjeni tijekom 36 tjedana. Nakon razdoblja hranjenja, kunići su pretrpjeli značajne srčane ozljede kao što su fibroza i smanjen kardiopulmonalni kapacitet te su bili podvrgnuti terapiji G-CSF-om tijekom pet dana. Ovaj protokol je ponovljen tri puta s vremenskim intervalom od sedam

dana. Nakon terapije G-CSF-om, uočeno je nekoliko pozitivnih učinaka, kao što su smanjenje srčane fibroze, smanjenje razine inzulina, poboljšanje kardiopulmonalnog kapaciteta, ubrzano smanjenje tjelesne težine i reverzibilne srčane promjene. Stoga se čini da je G-CSF zaštitni agens za kardiomiocite u sprječavanju hipertrofije uz mogućnost oporavka od dijabetičke kardiomiopatije (25).

U pokušaju da se utvrdi učinak G-CSF-a na zaštitu od zatajenja srca, miševima je induciran srčani udar. Podijeljeni su u tri različite skupine kako bi se primijenila tri različita protokola primjene G-CSF-a. Prvi protokol uključivao je primjenu G-CSF-a s manjim dozama i duljim intervalom. Srčani udar je induciran u 46 miševa i nakon 12 tjedana, od kojih su 24 miša preživjela. Preživjeli miševi su podijeljeni u dvije skupine nakon ispitivanja ehokardiografskih parametara. Jedna skupina primala je supkutani G-CSF tokom četiri uzastopna tjedna. Druga skupina je primila jednaku količinu fiziološke otopine. Drugi protokol je napravljen za procjenu odgođenih učinaka G-CSF-a nakon dugotrajne terapije G-CSF-om čak i nakon prekida liječenja. Srčani udar izazvan je u 36 miševa, od kojih je 20 miševa preživjelo nakon osam tjedana. Procijenjeni su ehokardiografski parametri te su preživjeli miševi razdvojeni u dvije skupine. Istom metodom spomenutom u prvom protokolu, G-CSF i fiziološka otopina su ubrizgavani tijekom dva tjedna. Treći protokol usmjeren je na procjenu učinka G-CSF-a na indukciju regeneracije miokarda stanicama koštane srži. Srčani udar induciran je u 15 miševa. Dvanaest tjedana kasnije, 9 miševa je preživjelo i primijenjen je G-CSF ili fiziološka otopina. Razdoblje terapije je bilo četiri tjedna s istim protokolom koji je gore spomenut. Nakon šesnaest tjedana, rezultati su pokazali G-CSF stimuliranu ekspresiju receptora za G-CSF u ozlijeđenom miokardu s pozitivnom povratnom spregom ovisnom o sebi (autoindukcija). Poznato je da infarktna mišja srca ekspimiraju receptore za G-CSF endogeno. Terapija G-CSF-om smanjila je fibrozu srca i hipertrofirane preživjele kardiomiocite. Drugi rezultat ove studije bio je postojanje stanica

dobivenih iz koštane srži u srcima sa ožiljkom od srčanog udara koje su sadržavale mali broj stanica sličnih fibroblastima i leukocita bez kardiomiocita i vaskularnih stanica. Zaključeno je da G-CSF nije razlog njihove prisutnosti. Ovaj nalaz ukazuje da G-CSF neznatno pridonosi regeneraciji miokarda nakon starog infarkta. Ipak, nije moguće isključiti mogućnost da je ranije bio prisutan određeni broj kardiomiocita dobivenih iz koštane srži. Primjetno je da su tijekom primjene G-CSF-a njegovi učinci na srčanu funkciju trajali najmanje dva tjedna (26).

Provedeno je još jedno istraživanje kako bi se pokazalo djelovanje G-CSF-a na morfološki i fiziološki oporavak u ozlijeđenim srcima. Ozljeda srca uzrokovana je izoproterenolom. Ozljeda srca specificirana je hipertrofijom ventrikula, fibrozom srca te povišenim srednjim arterijskim tlakom i frekvencijom pulsa. G-CSF je zaliječio srčanu ozljedu vjerojatno mehanizmom regrutacije stanica iz koštane srži u krv. Terapija G-CSF-om dovela je do regresije srčane fibroze u odsutnosti slabljenja hipertrofije ili poboljšanja hemodinamskih parametara. U svrhu utvrđivanja uloge mobiliziranih stanica u reparaciji srca, mobilizirane matične stanice iz jedne skupine zdravih miševa su uzete i prebačene u drugu skupinu koja je pretrpjela srčanu ozljedu. Rezultati su pokazali isti ishod kao i kod primjene G-CSF-a. Osim toga, inokulacija je brže stabilizirala arterijski tlak. Ovi rezultati pokazuju da su stanice bez ovisnosti o G-CSF-u odgovorne za rekonstrukciju oštećenog srca (27).

Druga studija provedena je na 45 mušjaka štakora otrovanih ugljikovim monoksidom tijekom šezdeset minuta u dozi od 3000 ppm kako bi se inducirala srčana ishemija. Nakon procesa trovanja, štakori su odmah podvrgnuti terapiji G-CSF-om tijekom pet kontinuiranih dana. Kako bi se ustanovilo da li se proteini ekspimiraju nakon primitka G-CSF-a, napravljena je Western blot analiza. Ovi proteini su uključivali JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, Akt1 i p-Akt1. G-CSF štiti srčane miocite nakon ishemije/reperfuzije Akt1 fosforilacijom (28).

Nakon izlaganja ugljičnom monoksidu slijedi apoptoza kardiomiocita štakora. Rezultati su pokazali da je evidentno sudjelovanje JAK2/STAT3 i PI3k/Akt u prevenciji apoptoze u srčanim miocitima štakora. Analiza rezultata pokazala je da G-CSF povećava fosforilirani oblik Akt1, JAK2 i STAT 3 bez promjene ukupne količine navedenih proteina. Drugim riječima, G-CSF terapija dovela je do zaštite srca zbog svog učinka na povećanje fosforiliranih proteina. Osim toga, G-CSF smanjuje transkripciju proteina koji induciraju apoptozu kao što su Bad i kaspaza 3 (29). Očekuje se da će nakon infarkta miokarda otprilike polovica svih pacijenata razviti kronično zatajenje srca (30). Sukladno tome, G-CSF bi trebao poboljšati funkciju kroničnog zatajenja srca.

4.2 Mehanizam djelovanja

Točan mehanizam djelovanja G-CSF-a nije u potpunosti razjašnjen. Mobilizacija matičnih stanica koštane srži i njihov dolazak u oštećeni miokard je najrazjašnjeniji mehanizam. Također, predloženo je da G-CSF ubrzava proces ozdravljenja poticanjem faktora rasta i smanjenjem rane ekspanzije ventrikula nakon infarkta miokarda kroz taloženje kolagena u ozljeđenom području (31). Nadalje, kroz aktivaciju specifičnih receptora u srcu, G-CSF može poboljšati preživljavanje kardiomiocita i smanjiti učestalost apoptoze. Čini se da opskrbom endotelnih progenitornih stanica i angiogenim čimbenicima, G-CSF može poboljšati srčanu funkciju i promijeniti ishemijski status zahvaćenog miokarda .

4.3 Kliničke studije

4.3.1 Slučajevi teškog kroničnog zatajavanja srca s implantabilnim kardioverter-defibrilatorom

Provedena je studija koja je uključivala 6 slučajeva teškog zatajenja srca s frakcijom izbacivanja lijeve klijetke manjom od 35 posto, a sudionici su imali implantabilni kardioverter-defibrilator. Terapijski plan uključivao je davanje G-CSF-a s rastućim dozama radi osiguranja sigurnosti. Pacijenti su podvrgnuti kliničkim procjenama, uključujući elektrokardiografske studije, plazma citokine i protočnu citometriju za određivanje broja CD34+ stanica prije terapije G-CSF-om. Primjena lijeka prekinuta je u 6 pacijenata zbog povišenja alkalne fosfataze. Među tim pacijentima, troje je koristilo cijelu dozu od 25 g/kg, dvoje je koristilo 22,5 g/kg u razdoblju od pet dana, a jedan pacijent primio je ukupnu dozu od 10 g/kg prije prestanka uzimanja lijeka. Doza se povećavala ukoliko se učinak lijeka s prvom primjenom doze nije pokazao. Međutim, svi bolesnici su reagirali na početne doze i prilagodba doze nije bila potrebna. Praćenje bolesnika s laboratorijskim i kliničkim procjenama provedeno je 6, 8 i 10 dana nakon primjene lijeka, a zatim nakon 6 tjedana, 3 mjeseca i 9 mjeseci. Porast razine CD34+ stanica u perifernoj krvi za više od 10 stanica/ μ l bio je primaran cilj. Navedena količina CD34+ stanica je prihvatljiva za transplantaciju. Sekundarne krajnje točke bile su sigurnost, promjene frakcije izbacivanja lijeve klijetke i promijenjene razine citokina u plazmi. Primjena doze od 5 μ g/kg/dan G-CSF-a u razdoblju od 5 dana povećala je količinu CD34+ hematopoetskih matičnih stanica. Primijećeno je značajno poboljšanje frakcije izbacivanja lijeve klijetke u 4 bolesnika koji su patili od ishemijske kardiomiopatije nakon devetomjesečnog praćenja. Također, utvrđeno je nestatički značajno smanjenje sistoličke i dijastoličke dimenzije lijeve klijetke. Razine citokina u plazmi (interferon- γ , TNF- α ili IL-2, IL-4, IL-5) nisu se značajno poboljšale tijekom primjene G-CSF-a. Međutim, razina IL-10 u plazmi značajno se povećala. Nakon 6 tjedana vratila se na

početnu razinu. Bolesnici su praćeni 9 mjeseci, a kardiovaskularne nuspojave nisu se pojavile. Predloženo je da terapija niskim dozama G-CSF-a može značajno mobilizirati hematopoetske matične stanice u bolesnika s uznapredovalim zatajenjem srca. Također, može poboljšati funkciju lijeve klijetke u bolesnika s ishemijskom kardiomiopatijom. Ove prednosti praćene su malim nuspojavama G-CSF-a. Mobiliziranje hematopoetskih matičnih stanica dobivenih iz koštane srži moguća je opcija lijećenja akutnog infarkta miokarda i kroničnog zatajenja srca. Neutrofilija je uočena pri primjeni G-CSF-a, međutim, to nije rezultiralo prekidom lijećenja G-CSF-om ni u jednog bolesnika. Pacijenti s kroničnim zatajenjem srca imaju niže razine IL-10 u plazmi, a s time i očekivano teže zatajenje srca. Razlog tome je inhibicija oslobađanja TNF- α od strane IL-10 iz mononuklearnih stanica u perifernoj krvi pacijenata koji pate od kroničnog zatajenja srca. G-CSF utječe na proizvodnju IL-10 i kao rezultat toga smanjuje ex-vivo proizvodnju TNF- α . Stoga je moguće da osim učinka G-CSF na neovaskularizaciju i diferencijaciju matičnih stanica u stanice miokarda, G-CSF mijenja ukupni učinak citokina u protuupalni fenotip. Dakle, ova studija na maloj populaciji pacijenata s uznapredovalim zatajenjem srca pokazuje da G-CSF terapija može rezultirati daljnjim komplementarnim dobrobitima za miokard. Ograničenje ove studije bila je mala ispitivana populacija (32).

4.3.2 Slučajevi teškog kroničnog zatajivanja srca s prijašnjim infarktom

Provedena studija je uključivala 13 pacijenata s infarktom miokarda i ishemijskim zatajenjem srca s klasom New York Heart Association (NYHA) i/ili Canadian Cardiovascular Society (CCS) ≥ 3 . Odabrani bolesnici bili su neprikladni za revaskularizaciju, a njihovi simptomi se nisu promijenili nakon mjesec dana lijećenja ili implantacije biventrikularnog pacemakera. Pacijenti su podvrgnuti kliničkim pregledima uključujući procjenu SPECT snimanja

usmjerenog na stres/mirovanje, te indekse simptoma i kvalitete života na početku studije i 4 mjeseca nakon liječenja. NYHA i CCS razredi, Seattle Angina Questionnaire (SAQ), Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire (MLHFQ) i Visual Analogue Scale (VAS) bili su korišteni kao indeksi procjene simptoma i kvalitete života. SAQ je upitnik od 19 stavki koji procjenjuje učinak angine na tjelesnu aktivnost, nedavne promjene težine angine, učestalost napadaja angine, zadovoljstvo liječenjem i percepciju bolesti. Ovaj upitnik ima raspon od 0 do 100, a veći rezultat znači bolje zdravstveno stanje pacijenata. MLHFQ procjenjuje kako zatajenje srca i njegovo liječenje utječu na kvalitetu života pacijenta. Ovaj upitnik sadrži 21 pitanje o tome kako je bolest spriječila pacijente da žive kako su željeli i traži od njih da ocjenjuju te aspekte od 0 do 5. Za procjenu volumena lijevog ventrikula, perfuzije i funkcije korišten je ^{99m}Tc SPECT. Ovi indeksi mjereni su prema Cedars-Sinaiovim kriterijima. Kako bi se procijenio broj CD34+ stanica, uzet je uzorak krvi na početku studije te 5. i 10. dan nakon primjene G-CSF-a. Klase NYHA i CSS pokazale su značajno poboljšanje, a isto tako i tjelesna ograničenja, učestalost i stabilnost angine, kvaliteta života i rezultati perfuzije. Malo je vjerojatno da su se mobilizirane matične stanice iz koštane srži usadile u srčano tkivo. Osim toga, čini se da G-CSF nema utjecaja na apoptotički put kardiomiocita i kao rezultat toga nije spriječeno nepoželjno remodeliranje. Prema ovom istraživanju, korištenje G-CSF-a je sigurno u bolesnika koji pate od ishemijskog zatajenja srca i/ili perzistentne angine pectoris. Slučajevi ishemijskog zatajenja srca koji nisu kandidati za revaskularizaciju bolje reagiraju na G-CSF, vjerojatno zbog smanjenja ishemije izazvane stresom. Za bolju kvalitetu života vjerojatno je odgovorno smanjenje stresom inducirane ishemije. Unatoč poboljšanju simptoma i kvalitete života, nije otkrivena značajna promjena u ejekcijskoj frakciji lijevog ventrikula, što je bio primarni cilj u većini kliničkih ispitivanja citoterapije u akutnom infarktu miokarda i kroničnom zatajenju srca. Međutim, teško je pronaći jasnu korelaciju između perfuzije miokarda, kvalitete života i simptoma. Ova

studija je pokazala značajno poboljšanje perfuzije miokarda pod stresom te moguće objašnjenje za poboljšanje simptoma i bolju kvalitetu života bolesnika. Bez drugih učinkovitih mogućnosti liječenja, u bolesnika koji nisu prikladni kandidati za revaskularizaciju i imaju teške simptome, korištenje G-CSF-a može biti opcija. Kako bi se pokazali dugoročni korisni učinci novog liječenja, potrebno je randomizirano dvostruko slijepo kliničko ispitivanje (33).

4.3.3 Slučajevi teškog kroničnog zatajivanja srca s dilatativnom ili ishemijskom kardiomiopatijom

U ovom kliničkom ispitivanju sudjelovalo je 16 muških pacijenata koji su patili od kroničnog srčanog zatajenja, NYHA klase III ili IV zbog proširene ili ishemijske kardiomiopatije. Bolesnici su primili 4 ciklusa terapije G-CSF-om supkutano. Svaki ciklus je trajao 10 dana nakon čega je uslijedila desetodnevna stanka, tijekom koje nije bila ordinirana terapija. Kontrolni pregledi provedeni su jednom mjesečno nakon početka liječenja, tijekom 6 mjeseci. Doza G-CSF-a (početna doza: 480 µg/sc dva puta dnevno) prilagođavala se na dnevnoj bazi kako bi se postigao broj leukocita od 45.000/µl do 4. dana i održavala razina od 45.000 – 50.000/µl do 10. dana. Ovaj ciljni raspon je odabran jer se prethodno pokazalo da se dobro podnosi i da je povezan s visokom razinom mobilizacije matičnih stanica. Broj leukocita je utvrđivan svakodnevno, a CD34+ stanice određivane su protočnom citometrijom. Sigurnosne analize su uključivale fizikalni pregled, ultrazvuk slezene, elektrokardiogram i laboratorijske pretrage. Kako bi se procijenila učinkovitost, provedena je ehokardiografija, šestominutni test hoda i procjena NYHA klasifikacije. Najveći broj CD34+ stanica bio je nepromijenjen u svakom ciklusu. Nakon četiri primjene G-CSF-a, 9 od 12 pacijenata pokazalo je značajno poboljšanje u udaljenosti od šest minuta hoda i NYHA razredu.

Suprotno ovim nalazima, niti jedna od 8 kontrola ishemijske kardiomiopatije nije imala promjenu u NYHA klasi tijekom sličnog vremenskog razdoblja. Ehokardiografski parametri nisu se značajno promijenili tijekom ispitivanja. Odgovor u skupini pacijenata s dilatativnom kardiomiopatijom bio je jednak ishemijskoj skupini. Najveća zabrinutost bila je pojava ventrikularne fibrilacije i povećane mogućnosti pojave angine pektoris uz primjenu G-CSF-a. Studija može otkriti da pacijenti s koronarnom arterijskom bolešću koji primaju G-CSF mogu biti izloženi velikom riziku. Zbog strukturalnih razloga, bolesnici s dilatativnom kardiomiopatijom imaju manji rizik od štetnih učinaka visokog broja leukocita u usporedbi s bolesnicima s ishemijskom. Mobiliziranje matičnih stanica uzastopnim korištenjem G-CSF-a u spomenutoj studiji bilo je praktično. Najznačajnije ograničenje ove studije bila je mala veličina uzorka, a osim toga, veza između poboljšanja simptoma i placebo učinka nije mogla biti isključena zbog odsutnosti kontrolne skupine (34).

4.3.4 Učinkovitost

Nakon analize animalnih modela u kojima se navodi da G-CSF mobilizira matične stanice koštane srži u infarktno srce i ubrzava diferencijaciju vaskularnih stanica i kardiomiocita, pokazalo se slično djelovanje u kliničkom modelu . G-CSF djeluje kroz različite mehanizme uključujući prevenciju remodeliranja lijeve klijetke i disfunkciju nakon infarkta miokarda, smanjenjem apoptotičkih stanica i povećanjem vaskularnih stanica, promicanjem angiogeneze i aktivacijom različitih signalnih putova kao što su Akt, kinaza regulirana izvanstaničnim signalom i Janus kinaza 2/pretvornik signala i aktivator transkripcije 3. Ovi nalazi upućuju na to da G-CSF, ne samo da inducira mobilizaciju matičnih stanica i progenitornih stanica, već također djeluje izravno na kardiomiocite. Stoga se G-CSF može upotrijebiti kao novo sredstvo za zaštitne i regenerativne učinke na ozlijeđeni miokard.

Sigurnost i učinkovitost njegove primjene potrebno je potvrditi dodatnim kliničkim ispitivanjima, ali dosadašnja istraživanja sugeriraju da bi primjena G-CSF-a mogla predstavljati novu terapijsku strategiju za liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem srca.

5. RASPRAVA

Otkako je osamdesetih godina prošlog stoljeća došlo do otkrića G-CSF-a, provedena su brojna klinička istraživanja njegovih učinaka, mehanizma djelovanja, interakcija s drugim lijekovima i spojevima. Brojne studije uključivale su najprije klinička ispitivanja na animalnim modelima, a kasnije se pokušalo i s eksperimentalnom primjenom u ljudi. Jedan od prvih pozitivnih učinaka G-CSF-a otkriven je istraživanjem provedenim u animalnom modelu sepse. Dokazano je smanjenje smrtnosti od pneumonije uzrokovane gram-negativnim bakterijama, uključujući i *Klebsiella pneumoniae*, a osim toga, pokazalo se da je primjena G-CSF-a uspješna kao suplement antimikrobnoj terapiji u liječenju infekcije uzrokovane *Pseudomonas aeruginosa* u modelu opeklina, intramuskularne infekcije i hemoragičnog šoka. U animalnim modelima intraaperitonealne infekcije, upotrebom G-CSF-a dokazano je veće preživljenje u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Poboljšano preživljenje dokazano je i u animalnim modelima infekcije kardiovaskularnog sustava. Studije koje su provedene na animalnim modelima od velikog su značaja za ljude jer se otkrićem ovih pozitivnih učinaka moglo pristupiti eksperimentalnom ispitivanju učinka G-CSF-a kod infekcija u ljudi pa je provedena *ex vivo* studija stimuliranog oslobađanja proupalnih citokina i inhibitora protuupalnih citokina u krvi dobivenoj od zdravih dobrovoljaca koji su primili jednu ili dvije dnevne doze G-CSF ili placeba. Istraživači su zaključili da terapija G-CSF može potaknuti sistemski protuupalni odgovor tijekom infekcije ili drugih upalnih stanja. Temeljem dosadašnjih istraživanja pretpostavlja se da G-CSF ima učinke od uništavanja mikroorganizama do smanjenja regulacije nekih štetnih aspekata sistemskog upalnog odgovora. Provedena istraživanja učinaka G-CSF-a na primjenu endotoksina kod ljudi podržale su njegovu sigurnost, kao i njegovu sposobnost da blokira neke od učinaka LPS-a, vjerojatno kroz modifikaciju odgovora citokina.

Osobe koje boluju od dijabetesa melitusa česte su infekcije, osobito stopala, koje se teško liječe, a terapijski neuspjeh često dovodi do amputacije donjih ekstremiteta. Gotovo sve inficirane lezije stopala zahtijevaju antibiotsku terapiju, ali prodor antibiotika do inficiranog mekog tkiva i kosti može biti neadekvatan. Ove infekcije također mogu biti refraktorne na liječenje zbog neodgovarajućeg kirurškog debridmana, neoptimalne skrbi za ranu ili teške ishemije ekstremiteta. Osim toga, dijabetes je povezan s imunološkim nedostacima, uključujući abnormalnu kemotaksiju i fagocitozu neutrofila. Istraživanja provedena na ovoj populaciji uključivala su primjenu G-CSF-a supkutano, intramuskularno ili intravenozno. Iako su rezultati nekih studija pokazali da nedostaju dokazi da liječenje G-CSF-om pomaže u liječenju infekcije ili poboljšanju cijeljenja ulkusa stopala u osoba s dijabetesom, potrebno je provođenje dodatnih istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se procijenila korisnost terapije. No, bez obzira na ove rezultate, G-CSF je pokazao pozitivne učinke što se tiče smanjenja učestalosti amputacija donih ekstremiteta i ostalih kirurških intervencija povezanih s infekcijom stopala, a smanjenje učestalosti ovih komplikacija od velikog je značaja ne samo za pacijenta već i za cjelokupni zdravstveni sustav.

Provedena su i istraživanja na animalnim modelima koja uključuju učinak G-CSF-a na kardiovaskularni sustav. Po izazvanim srčanim ozljedama, životinjama je ordinirana terapija G-CSF-om te je nakon terapije G-CSF-om, uočeno nekoliko pozitivnih učinaka, kao što su smanjenje srčane fibroze, smanjenje razine inzulina, poboljšanje kardiopulmonalnog kapaciteta, ubrzano smanjenje tjelesne težine i reverzibilne srčane promjene. Primjenom G-CSF-a u ljudi koji boluju od kroničnog srčanog zatajenja ili su preživjeli infarkt miokarda istraživanja su pokazala da G-CSF, ne samo da inducira mobilizaciju matičnih stanica i progenitornih stanica, već također djeluje izravno na kardiomiocite. Stoga se G-CSF može upotrijebiti kao novo sredstvo za zaštitne i regenerativne učinke na ozlijeđeni miokard. Sigurnost i učinkovitost njegove primjene potrebno je potvrditi dodatnim kliničkim

ispitivanjima, ali dosadašnja istraživanja sugeriraju da bi primjena G-CSF-a mogla predstavljati novu terapijsku strategiju za liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem srca.

6. ZAKLJUČAK

G-CSF je faktor rasta koji stimulira proliferaciju i maturaciju neutrofila te pospješuje njihov prelazak iz koštane srži u krv, a njegovi učinci posredovani su vezanjem na G-CSF receptor. U kliničkoj praksi ima uske terapijske indikacije kao što su febrilna neutropenija, pacijenti koji primaju mijeloablativnu terapiju prije presađivanja koštane srži, dodatak uz citotoksičnu kemoterapiju, kongenitalna neutropenija i perzistentna neutropenija u pacijenata oboljelih od HIV infekcije. U studijama koje se bave primjenom G-CSF-a kod populacije koja boluje od dijabetesa melitusa uočeni su brojni pozitivni učinci kao što su povećano oslobađanje neutrofila iz koštane srži i poticanje njihove funkcije te smanjenje učestalosti amputacije udova i ostalih kirurških intervencija. Pozitivni učinci G-CSF-a uočeni su i u kliničkim istraživanjima akutne bakterijske infekcije, gdje se došlo do zaključka da G-CSF blokira neke od učinaka LPS-a modifikacijom odgovora citokina. Sigurnost i učinkovitost primjene G-CSF-a potrebno je potvrditi dodatnim kliničkim ispitivanjima, ali dosadašnja istraživanja sugeriraju da bi njegova primjena mogla također predstavljati novu terapijsku strategiju za liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem srca.

7. SAŽETAK

G-CSF je faktor rasta bijelih krvnih stanica koji pospješuje maturaciju neutrofila koji igraju ključnu ulogu u antimikrobnom djelovanju te također stimulira njihovu proliferaciju i potiče prelazak iz koštane srži u krv. Vežanjem na homodimerni receptor, G-CSFR, ostvaruje svoje učinke. Kliničkim istraživanjima na animalnim modelima, a kasnije i eksperimentalnom upotrebom u ljudi, došlo se do mnogobrojnih spoznaja o samom učinku i mehanizmu djelovanja G-CSF-a. Provedenim istraživanjima dokazani su mnogobrojni pozitivni učinci koji uključuju blokiranje učinaka LPS-a modifikacijom odgovora citokina, smanjenje učestalosti amputacije ekstremiteta i kirurških zahvata povezanih s komplikacijama dijabetičkog stopala, indukciju mobilizacije matičnih stanica i progenitornih stanica uz izravan učinak na kardiomiocite u miokardu koji je pretrpio infarkt ili kod kroničnog srčanog zatajenja. Sigurnost i učinkovitost njegove primjene potrebno je potvrditi dodatnim kliničkim ispitivanjima, ali dosadašnja istraživanja sugeriraju da bi primjena G-CSF-a mogla predstavljati novu terapijsku strategiju za liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem srca, dijabetičkim stopalom ili bakterijskom infekcijom.

Ključne riječi: G-CSF, animalni modeli, kliničko istraživanje, liječenje

8. SUMMARY

G-CSF is a white blood cell growth factor that promotes the maturation of neutrophils that play a key role in antimicrobial activity and also stimulates their proliferation and promotes the transition from bone marrow to blood. By binding to the homodimeric receptor, G-CSFR, it exerts its effects. Clinical research on animal models, and later experimental use in humans, has provided much insight into the effect and mechanism of action of G-CSF. Numerous positive effects have been demonstrated, including blocking the effects of LPS by modifying cytokine responses, reducing the frequency of limb amputations and surgical procedures associated with diabetic foot complications, inducing stem cell and progenitor cell mobilization with a direct effect on cardiomyocytes or myocardial infarction. in chronic heart failure. The safety and efficacy of its use need to be confirmed by additional clinical trials, but research to date suggests that the use of G-CSF could represent a new therapeutic strategy for the treatment of patients with chronic heart failure, diabetic foot or bacterial infection.

Keywords: G-CSF, animal models, clinical research, treatment

9. LITERATURA

1. Smith WS, Sumnicht GE, Sharpe RW, Samuelson D, Millard FE. Granulocyte colony-stimulating factor versus placebo in addition to penicillin G in a randomized blinded study of gram-negative pneumonia sepsis: analysis of survival and multisystem organ failure. *Blood*. 1995;86(4):1301-1309.
2. Hustinx WN, Van Kessel CP, Heezius E, Burgers S, Lammers JW, Hoepelman IM. Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment on granulocyte function and receptor expression in patients with ventilator-dependent pneumonia. *Clin Exp Immunol*. 1998;112(2):334-340.
3. Nelson S, Summer W, Bagby G, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances pulmonary host defenses in normal and ethanol-treated rats. *J Infect Dis*. 1991;164(5):901-906.
4. Hebert JC, O'Reilly M, Gamelli RL. Protective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor against pneumococcal infections in splenectomized mice. *Arch Surg*. 1990;125(8):1075-1078.
5. Silver GM, Gamelli RL, O'Reilly M. The beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in combination with gentamicin on survival after *Pseudomonas* burn wound infection. *Surgery*. 1989;106(2):452-456.
6. Abraham E, Stevens P. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in modifying mortality from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia after hemorrhage. *Crit Care Med*. 1992;20(8):1127-1133.
7. Eichacker PQ, Waisman Y, Natanson C, et al. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. *J Appl Physiol (1985)*. 1994;77(5):2366-2373.

8. Hartung T, Döcke WD, Gantner F, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*. 1995;85(9):2482-2489.
9. Van Deventer, S. J. H. (1995). Progress in cytokine research and implications for immunotherapy of sepsis. *Clinician*, 13, 9-13.
10. Hartung T. Granulocyte colony-stimulating factor: its potential role in infectious disease. *AIDS*. 1999;13 Suppl 2:S3-S9.
11. Weiss M, Moldawer LL, Schneider EM. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood*. 1999;93(2):425-439.
12. McKenna P, Nelson S, Andresen J. Filgrastim (rHuG-CSF) enhances ciprofloxacin uptake and bactericidal activity of human neutrophils in vitro [abstract 535, American Thoracic Society meeting, May, 1996]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;153:A535.
13. Annane D, Sibille C, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288(7):862–71.
14. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New England Journal of Medicine* 2001;344(10):699–709.
15. Nelson S, Heyder AM, Stone J, Bergeron MG, Daugherty S, Peterson G. A randomized controlled trial of filgrastim for the treatment of hospitalized patients with multilobar pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 2000;182(3): 970–3.

16. Wunderink R, Leeper K Jr, Schein R, Nelson S, DeBoisblanc B, Fotheringham N, et al. Filgrastim in patients with pneumonia and severe sepsis or septic shock. *Chest* 2001; 119(2):523–9.
17. Root RK, Lodato RF, Patrick W, Cade JF, Fotheringham N, Milwee S, et al. Multicenter, double-blind, placebocontrolled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Critical Care Medicine* 2003;31(2):367–73.
18. Cheng AC, Limmathurotsakul D, Chierakul W, et al. A randomized controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of severe sepsis due to melioidosis in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2007;45(3):308-314.
19. Moulik PK, Mtonga R, Gill GV. Amputation and mortality in new-onset diabetic foot ulcers stratified by etiology. *Diabetes Care* 2003;26(2):491–4.
20. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999;26(3-4):259–65.
21. Cruciani M, Lipsky BA, Mengoli C, de Lalla F. Are granulocyte colony-stimulating factors beneficial in treating diabetic foot infections? A meta-analysis. *Diabetes Care* 2005;28(2):454–60.
22. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(12):e132–73.
23. Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(3):H823-H832.

24. Milberg P, Klocke R, Frommeyer G, et al. G-CSF therapy reduces myocardial repolarization reserve in the presence of increased arteriogenesis, angiogenesis and connexin 43 expression in an experimental model of pacing-induced heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):995-1008.
25. Daltro PS, Alves PS, Castro MF, et al. Administration of granulocyte-colony stimulating factor accompanied with a balanced diet improves cardiac function alterations induced by high fat diet in mice. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:162. Published 2015 Dec 3.
26. Li Y, Takemura G, Okada H, et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest.* 2006;86(1):32-44.
27. B. Nieto-Lima, A. Cano-Martinez, G. Zarco-Olvera, F.A. Masso-Rojas, A. Paez-Arenas and V. Guarner-Lans, 2016. GCSF Partially Repairs Heart Damage Induced by Repetitive β -adrenergic Stimulation in Mice: Potential Role of the Mobilized Bone Marrow-derived Cells. *International Journal of Pharmacology*, 12: 689-700.
28. Hasegawa H, Takano H, Iwanaga K, et al. Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(4):842-849.
29. Hashemzaei M, Imen Shahidi M, Moallem SA, Abnous K, Ghorbani M, Mohamadpour AH. Modulation of JAK2, STAT3 and Akt1 proteins by granulocyte colony stimulating factor following carbon monoxide poisoning in male rat. *Drug Chem Toxicol.* 2016;39(4):375-379. doi:10.3109/01480545.2015.1123267
30. Wolk MJ, Scheidt S, Killip T. Heart failure complicating acute myocardial infarction. *Circulation.* 1972;45(5):1125-1138.

31. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiated into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104(12):3581–7.
32. Joseph J, Rimawi A, Mehta P, et al. Safety and effectiveness of granulocyte-colony stimulating factor in mobilizing stem cells and improving cytokine profile in advanced chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2006;97(5):681-684.
33. Leone AM, Giannico MB, Bruno I, et al. Safety and efficacy of G-CSF in patients with ischemic heart failure: the CORNER (Cell Option For Recovery in the Non-Eligible Patients for Revascularization) study. *Int J Cardiol.* 2011;150(1):75-78.
34. Hüttmann A, Dührsen U, Stypmann J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor-induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure-- Feasibility, safety and effects on exercise tolerance and cardiac function. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(1):78-86.

10. ŽIVOTOPIS

Alen Omerović rođen je 23.6.1994. u Zagrebu. Pohađao je Osnovnu školu Malešnica u Zagrebu. Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja upisuje Gimnaziju Lucijana Vranjanina te potom integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.