

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Magdalena Kaczor

Wpływ leczenia empagliflozyną na przebieg glikogenozy 1b

Promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Książek

Promotor pomocniczy: dr n. med. Dariusz Rokicki

Klinika Pediatrii, Żywienia i Chorób Metabolicznych

Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”

Kierownik kliniki dr n. med. Dariusz Rokicki

Warszawa 2024

Bardzo dziękuję:

Panu Profesorowi Januszowi Książkowi za stworzenie Kliniki, w której każdy lekarz uzyskuje zarówno mentorskie, jak i przyjacielskie wsparcie.

Dr n. med. Dariuszowi Rokickiemu za nauczenie mnie rzeczy, których nie można wyczytać w książkach, a rozszerzają horyzonty i pogłębiają percepcję świata oraz za codzienną pomoc w podejmowaniu decyzji i wsparcie po ich podjęciu.

Dr Dorocie Wesół – Kucharskiej i Dr Milenie Greczan za codzienne przyjacielskie wsparcie zarówno w pracy, jak i poza nią oraz za pasję odkrywania nowych medycznych łądów.

Tosi za naukę ergonomicznego wykorzystania czasu wolnego. Mamie i Mężowi, dzięki którym był jakiś czas wolny.

Bratu, najlepszemu redaktorowi.

Spis treści

1. Część wstępna	4
1.1. Wykaz skrótów	4
1.2. Słowa kluczowe:	4
1.3. Streszczenie w języku polskim	5
1.4. Streszczenie w języku angielskim	7
1.5. Wstęp	9
2. Teoretyczne podstawy pracy	11
2.1. Mechanizm powstania neutropenii w GSD 1b	11
2.2. Mechanizm działania inhibitora SGLT2 (empagliflozyny) na neutrofile u chorych na GSD 1b	12
3. Metodologiczne podstawy pracy (publikacje własne)	13
3.1. Przełom w leczeniu glikogenozy 1b?	13
3.2. Sodium-glucose cotransporter type 2 channel inhibitor: Breakthrough in the treatment of neutropenia in patients with glycogen storage disease type 1b?	13
3.3. Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin	14
3.4. Clinical characteristics and long-term outcomes of patients with glycogen storage disease type 1b: a retrospective multi-center experience in Poland	17
4. Cele pracy	20
5. Analiza i interpretacja wyników badań	21
6. Dyskusja	22
7. Wnioski	24
8. Piśmiennictwo:	25
9. Załączniki	27
9.1. Publikacja nr 1	28
9.2. Publikacja nr 2	32
9.3. Publikacja nr 3	40
9.4. Publikacja nr 4	70
9.5. Oświadczenia współautorów	76

1. Część wstępna

1.1. Wykaz skrótów

ALT – aminotransferaza alaninowa

AST – aminotransferaza asparaginowa

AFP – alfa – fetoproteina

AMPs – *Antimicrobial Peptides* – peptydy przeciwdrobnoustrojowe

CRP – C-reactive protein

EMPA – empagliflozyna

G6PT – transporter dla glukozy-6-fosforanu

G6P – glukozy-6-fosforan

GSD 1b – *Glycogen Storage Disease type 1b* – glikogenoza typu 1b

G-CSF – *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* – czynnik wzrostu dla kolonii granulocytów

IBD – *Inflammatory Bowel Disease* – choroba zapalna jelit

NETs – *Neutrophil Extracellular Traps* – zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe

SGLT2 – *Sodium-Glucose Transport Protein 2* – kotransporter sodowo-glukozowy typu 2.

1,5 AG – 1,5 anhydroglucitol

1,5 AG6P – fosforan 1,5 anhydroglucitolu

SSK – surowa skrobia kukurydziana

1.2. Słowa kluczowe: Glikogenoza 1b, neutropenia, 1,5-anhydroglucitol, inhibitor SGLT2, empagliflozyna.

Keywords: Glycogen storage disease type 1b, neutropenia, 1,5-anhydroglucitol, SGLT2 inhibitor, empagliflozin.

1.3. Streszczenie w języku polskim

Glikogenoza typu 1b (GSD 1b) jest rzadkim, dziedziczonym autosomalnie recesywnie (*SLC37A4*), deficytem transportera dla glukozy- 6- fosforanu (G6PT) w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER). Zmniejszony transport G6P do wnętrza ER zaburza glukoneogenezę i glikogenolizę, co prowadzi do epizodów hipoglikemii poposiłkowej, hipermleczanemii, hiperurykemii, hipertransaminazemii, hipertriglicydemii i hipercholesterolemii. Zwykle pierwszymi zwracającymi uwagę objawami są: niskorosłość, masywna hepatomegalia i charakterystyczna twarz z wydatnymi policzkami (tzw. twarz lalki). U pacjentów z GSD 1b obserwowane są także częste, zagrażające życiu zakażenia i choroba zapalna jelit (*Crohn- like*), co spowodowane jest obniżoną liczbą i nieprawidłowym funkcjonowaniem granulocytów obojętnochłonnych. Dotychczas stosowany w profilaktyce zakażeń, czynnik wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF) nie jest w pełni skuteczny i obserwuje się jego liczne działania niepożądane.

W wyniku deficytu G6PT w cytoplazmie neutrofilii magazynuje się fosforan 1,5- anhydroglucitolu (1,5 AG6P), który hamuje glikolizę beztlenową. Niedobór energii prowadzi do nadmiernej apoptozy neutrofilii, a także zaburza ich aktywność bakterio- i grzybobójczą (nieprawidłowa chemotaksja, fagocytoza i zaburzony „wybuch tlenowy”). Empagliflozyna (EMPA), inhibitor kotransportera sodowo- glukozyowego typu 2 (SGLT2) hamuje resorpcję zwrotną 1,5 AG z moczu, co zmniejsza stężenie 1,5 AG6P w neutrofilach.

Celem pierwszorzędowym pracy było porównanie skuteczności czynnika wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF) i empagliflozyny (EMPA) w leczeniu neutropenii w przebiegu GSD 1b.

Celem drugorzędowym było scharakteryzowanie polskiej populacji dzieci chorych na GSD 1b ze szczególnym uwzględnieniem najbardziej charakterystycznych, pierwszych objawów klinicznych, biochemicznych i występujących powikłań.

Z analizy wyników badań wyciągnięto następujące wnioski:

1) W polskiej, populacji pediatrycznej najczęstszym, pierwszym objawem GSD 1b jest ciężkie zakażenie w okresie noworodkowo-niemowlęcym. Tak jak w wielu wrodzonych neutropeniach, tak i w przebiegu GSD 1b w trakcie trwania zakażenia szpik kostny jest zdolny do „wyrzucenia” większej liczby neutrofilii, co może maskować przewlekły niedobór tych komórek. Dlatego szczególnie w razie występowania nawracających, ciężkich zakażeń i/lub podejrzenia GSD 1b,

konieczna jest kontrola morfologii krwi z rozmazem ręcznym po ustąpieniu objawów zakażenia i/lub normalizacji CRP (C-reactive protein).

2) Hipoglikemia w przebiegu GSD 1b, pomimo znacznego nasilenia, stosunkowo rzadko daje objawy, co dowodzi konieczności jej aktywnego poszukiwania (oznaczenie glikemii na czczo, wykonanie testu przedłużonego głodzenia) u chorego diagnozowanego w tym kierunku.

3) Stosowanie G-CSF w leczeniu neutropenii u pacjentów z GSD 1b nie przywraca ani prawidłowej liczby, ani odpowiedniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej neutrofilii.

4) Włączenie do leczenia EMPA korzystnie wpływa na częstość zakażeń i objawy choroby zapalnej jelit, co jest głównie wynikiem poprawy funkcjonowania przeciwdrobnoustrojowego neutrofilii.

5) Stosowanie EMPA, pomimo jego działania hipoglikemizującego, jest bezpieczne u pacjentów z GSD 1b.

6) EMPA wpłynęła korzystnie na wszystkie parametry aktywności przeciwdrobnoustrojowej granulocytów obojętnochłonnych z wyjątkiem syntezy wewnątrzkomórkowych i osoczowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) m.in. defensyn. Wytwarzanie AMPs było większe w trakcie leczenia G-CSF.

1.4. Streszczenie w języku angielskim

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is a rare autosomal recessively inherited disease (SLC37A4). GSD 1b is a deficiency of a transporter for glucose-6-phosphate (G6PT) in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Reduced transport of G6P into the ER interferes with gluconeogenesis and glycogenolysis, leading to episodes of postprandial hypoglycaemia, hyperlactatemia, hyperuricaemia, hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia. Typically, the first noticeable symptoms are short stature, massive hepatomegaly and a characteristic face with prominent cheeks (referred to as a 'doll face'). Patients with GSD 1b also exhibit frequent, life-threatening infections and inflammatory bowel disease (Crohn-like), which are caused by abnormal neutrophil function. So far, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) used to prevent infections has not been fully effective and numerous side effects have been observed.

As a result of G6PT deficiency, 1,5-anhydroglucitol phosphate (1,5 AG6P) is stored in the cytoplasm of neutrophils, which inhibits anaerobic glycolysis. This energy deficiency leads to excessive apoptosis of neutrophils and impairs their bactericidal and fungicidal activity (e.g. abnormal chemotaxis, phagocytosis, impaired 'oxygen burst'). Empagliflozin (EMPA), an inhibitor of the sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2), decreases the reabsorption of 1.5 AG from urine, which reduces the concentration of 1.5 AG6P in neutrophils.

This study aimed to assess the effect of treatment with the SGLT2 inhibitor, specifically on neutropenia and its complications in patients with GSD 1b.

The following conclusions were drawn from the analysis of the study results:

- 1) In the Polish pediatric population, the most common first manifestation of GSD 1b is severe infection during the neonatal-infant period. As in many congenital neutropenias, during an infection, in patients with GSD 1b, the bone marrow can "shed" more neutrophils, potentially masking a chronic deficiency of these cells. Therefore, especially in the presence of recurrent, severe infections or suspected GSD 1b, it is necessary to monitor blood counts with manual smears after the symptoms of infection have resolved or CRP has normalized.
- 2) Despite its significant severity, hypoglycaemia in the course of GSD 1b is relatively rarely symptomatic, which demonstrates the need to actively look for it (e.g. fasting blood glucose determination, prolonged starvation test) in patients diagnosed with this condition.

- 3) G-CSF treatment of neutropenia in patients with GSD 1b does not restore neutrophils' normal number or antimicrobial activity.
- 4) EMPA's inclusion in the treatment has a beneficial effect on the frequency of infections and symptoms of inflammatory bowel disease, mainly due to an improvement in neutrophil antimicrobial function.
- 5) EMPA's use, despite its hypoglycaemic effect, is safe in patients with GSD 1b.
- 6) EMPA positively affected all parameters of neutrophils' antimicrobial activity except the synthesis of intracellular and plasma antimicrobial peptides (AMPs), including defensins. AMP production was higher during G-CSF treatment.

1.5. Wstęp

Glikogenozy (*Glycogen storage disease*, GSD) to grupa kilkunastu, rzadkich, wrodzonych wad metabolizmu spowodowanych nieprawidłową degradacją lub rzadziej syntezą glikogenu (1)(2)(3). Uważany za najcięższy typ 1, związany jest z deficytem jednego z kluczowych enzymów zarówno glikogenolizy, jak i glukoneogenezy – glukozo-6-fosfatazy (podtyp „a”) lub z brakiem/niedoborem białka transportującego substrat dla tego enzymu (podtyp „b”) (1)(2)(3).

Najczęściej pierwsze objawy GSD 1 ujawniają się w 3-6 miesiącu życia, kiedy niemowlę zaczyna mieć dłuższe przerwy między posiłkami lub rozwinię infekcją, która zaburza normalny cykl karmień (1). Po około 3-4 godzinach przerwy w karmieniu, niemowlę rozwija objawy hipoglikemii, włącznie z epizodami napadowymi (1). Ponadto w badaniu przedmiotowym zwykle zwraca uwagę znaczna hepatomegalia. Badaniami laboratoryjnymi sugerującymi rozpoznanie jest znaczne obniżenie glukozy w surowicy (często do wartości <20mg/dl), nasilona hipermlęczanemia, hipertriglicerydemia, hipercholesterolemia, hiperurykemia, a także hipertransaminazemia (1)(2)(3). Co więcej, mogą pojawić się zaburzenia elektrolitowe, wynikające z uszkodzenia cewki proksymalnej nerek (zespół Fanconiego)(1). Zazwyczaj w badaniu USG jamy brzusznej stwierdza się znaczne powiększenie wymiarów wątroby i jej nieprawidłową echogeniczność, co spowodowane jest nadmiernym spicharzaniem się tłuszczu i glikogenu (1)(2). O ile powyższe zmiany w obrazie wątroby dotyczą większości glikogenoz, o tyle towarzyszące im powiększenie nerek jest patognomiczne dla GSD typu 1. Potwierdzeniem rozpoznania jest wykrycie nieprawidłowego wariantu molekularnego na obydwu allelach genu *G6PC* (podtyp „a”) lub *SLC37A4* (podtyp „b”) (1).

GSD 1 jest chorobą wielonarządową. Z czasem do powyżej opisanych objawów może dołączyć niedobór wzrostu, otyłość, nadciśnienie tętnicze, białkomocz i kamica układu moczowego (1). Postępujące szkliwienie kłębuszków nerkowych i przewlekła hiperurykemia prowadzą do przewlekłej choroby nerek wymagającej dializoterapii, zwykle w 3-4 dekadzie życia (1). W badaniach obrazowych wątroby u pacjentów z GSD 1, często są obserwowane zmiany ogniskowe zwykle o charakterze gruczolaków. Najczęściej powstają one w wyniku nieprzestrzegania zaleceń dietetycznych i mogą się zmniejszyć wraz z poprawą tzw. wyrównania metabolicznego. Pomimo łagodnego charakteru wymagają one kontroli w MRI co 6-12 miesięcy, z powodu ryzyka rozwoju *hepatocarcinoma*, w wykrywaniu którego alfa-fetoproteina (AFP) ma ograniczoną czułość i swoistość (1). Postępujące zmiany w mięszu

wątroby mogą także prowadzić do upośledzonej syntezy hepcydyny, białka kontrolującego absorpcję żelaza przez erytrocyt, co wraz ze zmniejszoną stężenia erytropoetyny wydzielanej przez uszkodzone nerki, prowadzi do ciężkiej niedokrwistości niereagującej na leczenie żelazem (1). Nieprzestrzeganie zaleceń żywieniowych skutkuje hipermlęczanemią, która na przestrzeni lat wpływa na obniżenie gęstości mineralnej kości, a także hipertriglicydemią mogącą prowadzić do ostrego zapalenia trzustki (największe ryzyko w przypadku stężenia >1000 mg/dl) (1).

Podstawą leczenia GSD 1 jest leczenie żywieniowe oparte na częstej (co 3-4 godziny w dzień i co 4-5 godziny w nocy) podaży bogatobiałkowych posiłków, które zawierają ograniczone ilości galaktozy i fruktozy (1). Dozwolona ilość węglowodanów prostych nie jest jednoznacznie określona, ze względu na różną aktywność resztkową deficytowego białka u poszczególnych pacjentów i wymaga indywidualnego dostosowania zaleceń dietetycznych. Wydłużenie przerw między posiłkami uzyskuje się dzięki podaży surowej skrobi kukurydzianej (SSK) (1)(2). SSK jest polimerem składającym się z cząsteczek glukozy, który dzięki powolnemu trawieniu (podobnie do rozkładu cząsteczki glikogenu), umożliwia dłuższe utrzymanie normoglikemii. Często obserwowane są jej działania niepożądane jak: biegunki, bóle i wzdęcia brzucha. W podtypie „a” możliwe jest zastosowanie *Glycosade*® (Nestlé), tj. zmodyfikowanej SSK, który ma dłuższy okres półtrwania niż klasyczna jej postać (według ChPL może wydłużać przerwę między posiłkami nawet do 6-8 godzin, co jest ważne szczególnie w nocy). Niestety u pacjentów z podtypem „b”, nie jest on dobrze tolerowany (1).

GSD 1b występuje rzadziej niż typ 1a (20% vs 80%), ale jej przebieg jest znacznie cięższy, z powodu neutopenii (1)(2)(3). Zwykle znacznie zmniejszona liczba granulocytów obojętnochłonnych powoduje częste, zagrażające życiu infekcje i nieswoiste zapalenie jelit z owrzodzeniami w jamie ustnej (*Crohn-like disease*) (1)(2)(3)(4)(5). W profilaktyce zakażeń stosowany jest czynnik wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF, filgrastim) (1)(2)(3). G-CSF zwiększa bezwzględną liczbę neutrofilii, jednak nadal zakażenia są pierwszą przyczyną zgonów w tej grupie chorych. W trakcie stosowania G-CSF obserwowane są liczne działania niepożądane: m.in. bóle kosto-stawowe, splenomegalia, hipersplenizm i zwiększone ryzyko nowotworów układu chłonnego (zespół mielodysplastyczny i ostra białaczka szpikowa).

2. Teoretyczne podstawy pracy

2.1. Mechanizm powstania neutropenii w GSD 1b

Pomimo, iż GSD 1b jest choroba znaną od prawie 100 lat (von Gierke, 1929), to do 2019 roku tj. ukazania się publikacji Veiga-da-Cunha M. et al. przyczyna neutropenii w przebiegu GSD 1b była nieznana.

W trakcie dojrzewania granulocyty obojętnochłonne tracą mitochondria, dlatego powstanie energii niezbędnej do ich funkcjonowania jest zależne od glikolizy beztlenowej. W pierwszym etapie tego procesu, glukoza dostaje się do cytoplazmy neutrofila poprzez transporter błonowy. Następnie jest fosforylowana przez heksokinazę do glukozy-6-fosforanu (G6P). G6P jest nie tylko kluczowym metabolitem glikolizy, ale także cyklu pentozofosforanowego, w którym generowany jest NADPH. Substrat ten jest konieczny do produkcji wolnych rodników tlenowych, warunkujących prawidłową aktywność przeciwdrobnoustrojową neutrofilii.

Obniżona liczba, a także nieprawidłowa funkcja neutrofilii u pacjentów z GSD1b spowodowana jest kumulacją w cytoplazmie neutrofilów fosforanu 1,5-anhydroglucitolu (1,5 AG6P), który hamuje glikolizę (4)(5). Niedobór energii prowadzi do nadmiernej apoptozy neutrofilii, a także zaburza ich aktywność bakterio- i grzybobójczą (nieprawidłowa chemotaksja, fagocytoza, zaburzony „wybuch tlenowy”) (4)(5). 1,5AG6P jest produktem fosforylacji 1,5-anhydroglucitolu (1,5AG), substancji nietoksycznej o niepoznanej dotychczas funkcji, która jest dostarczana do ludzkiego organizmu głównie z pożywieniem (w 10% jest to produkcja endogenna z glukozy w jelitach).

2.2. Mechanizm działania inhibitora SGLT2 (empagliflozyny) na neutrofile u chorych na GSD 1b

Po roku od odkrycia przyczyny neutropenii w przebiegu GSD 1b, prof. Wortmann opublikowała doniesienie o korzystnym wpływie inhibitora SGLT2 (empagliflozyny) na granulocyty obojętnochłonne w tej grupie chorych (5).

Kotransporter sodowo-glukozowy typu 2 (SGLT2) m.in. empagliflozyna (EMPA) jest odpowiedzialny w cewkach nerkowych za zwrotne wchłanianie glukozy z przesączu pierwotnego (5). Jego zablokowanie znacząco ogranicza zwrotne wchłanianie glukozy, co zmniejsza jej stężenie w surowicy, dlatego jego inhibitory są stosowane w leczeniu dorosłych pacjentów z cukrzycą typu II (5). Najczęściej raportowanymi działaniami niepożądanymi są epizody hipoglikemii (opisywane przy stosowaniu inhibitorów SGLT2 z innymi lekami hipoglikemizującymi) i większa częstość zakażeń układu moczowego.

Inhibitory SGLT2 zmniejszają resorpcję zwrotną w nerkach nie tylko glukozy, ale także jej strukturalnego analogu 1,5 anhydroglucitolu (1,5AG) (5). Dzięki temu zmniejsza się stężenie 1,5 AG w surowicy, a co za tym idzie jego fosforanu w cytoplazmie neutrofile (5). Profesor Wortmann we wspomnianej publikacji, przedstawiła 4 chorych z GSD 1b, u których po zastosowaniu EMPA zwiększyła się bezwzględna liczba neutrofile, a także poprawiła się ich funkcja przeciwdrobnoustrojowa (5). Nie obserwowano równocześnie istotnych działań niepożądanych takiego leczenia (nie stwierdzono zwiększonej częstości hipoglikemii, jedynie nieznaczny wzrost liczby zakażeń układu moczowego) (5).

3. Metodologiczne podstawy pracy (publikacje własne)

Podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej pod tytułem: „Wpływ leczenia empagliflozyną na przebieg glikogenozy 1b” są następujące publikacje:

3.1 Przełom w leczeniu glikogenozy 1b?

Magdalena Kaczor, Dorota Wesół-Kucharska, Milena Greczan, Dariusz Rokicki, Janusz Książyk.

Klinika Pediatryczna vol 30 Neurometabolizm 2022, strony 6021- 6024

Punkty MNiSW: 5.00

Praca stanowi artykuł poglądowy dotyczący objawów klinicznych i biochemicznych mogących sugerować rozpoznanie GSD1b. Szczegółowo omówiono w nim mechanizm działania empagliflozyny (EMPA) w leczeniu neutropenii u pacjentów z GSD 1b. Następnie podsumowano wszystkie dostępne w 2022 roku publikacje dotyczące takiego leczenia.

3.2. Sodium-glucose cotransporter type 2 channel inhibitor: Breakthrough in the treatment of neutropenia in patients with glycogen storage disease type 1b?

Magdalena Kaczor, Milena Greczan, Karolina Kierus, Ewa Ehmke Vel Emczyńska-Seliga, Elżbieta Ciara, Barbara Piątosza, Dariusz Rokicki, Janusz Książyk, Dorota Wesół-Kucharska.

JIMD Rep. 2022 Mar 2;63(3):199-206. doi: 10.1002/jmd2.12278. PMID: 35433171; PMCID: PMC8995836

Punkty MNiSW: 5.00

Cel pracy: Celem pracy jest analiza przebiegu GSD 1b u pacjentów, którym jako pierwszym w Polsce, włączono inhibitor kotransportera sodowo-glukozowego typu 2. (empagliflozyna).

Material i metody: Do badania włączono 4 pacjentów (2 dziewczynki, 2 chłopców) z najcięższą, pomimo leczenia G- CSF, neutropenią w przebiegu GSD 1b. Porównano u każdego pacjenta retrospektywnie dane kliniczne i biochemiczne z okresu przed włączeniem do tożsamego okresu po włączeniu leczenia empagliflozyną (EMPA). Najdłuższy okres leczenia wynosił rok i 5/12, najkrótszy 2 miesiące (mediana rok i 3 miesiące). Przeanalizowano historię choroby każdego pacjenta ze szczególnym uwzględnieniem częstości występowania

ciężkich infekcji (tj. wymagających antybiotykoterapii), częstości pilnych hospitalizacji z powodu infekcji, średniej częstości wypróżnień, występowania aft jamy ustnej, średniej stosowanej dawki G- CSF, średniej liczby neutrofilii i wyników badań laboratoryjnych tzw. parametrów wyrównania metabolicznego w czasie stosowania EMPA. Analogiczne dane zebrano z takiego samego okresu sprzed włączenia tego leczenia i porównano otrzymane wyniki.

Wyniki: Wszyscy pacjenci przed włączeniem EMPA byli niesatysfakcjonująco leczeni czynnikiem wzrostu kolonii granulocytów (G- CSF), który u 3/ 4 pacjentów odstawiono, a u jednego dawkę zmniejszono o 50%. U wszystkich pacjentów obserwowano znaczne zmniejszenie częstości ciężkich infekcji, a tym samym hospitalizacji z tego powodu w okresie leczenia EMPA. Ponadto u trzech najdłużej leczonych pacjentów stwierdzono znacznie zmniejszenie liczby wypróżnień na dobę i dni w miesiącu, w których pacjenci raportowali obecność aft w jamie ustnej. Porównując wyniki badań laboratoryjnych z okresu przed i po włączeniu EMPA, stwierdzono jej korzystny wpływ na medianę liczby neutrofilii w surowicy u 4/4 pacjentów i na stężenie kwasu moczowego w surowicy u 2/4. Na pozostałe parametry wyrównania metabolicznego, tj. stężenie glukozy, kwasu mlekowego, triglicerydów, cholesterolu całkowitego i transaminaz w surowicy, nie zauważono istotnego wpływu w obserwowanych okresach.

Wnioski: Analiza nasilenia neutropenii i objawów z niej wynikających u 4 pacjentów z GSD 1b, potwierdziła korzystny wpływ EMPA. Istotna kliniczna poprawa nie koreluje z nieznacznym wzrostem mediany liczby neutrofilii w surowicy, dlatego najprawdopodobniej wynika ona z poprawy w zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych komórek.

3.3. Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin.

Kaczor M, Malicki S, Folkert J, Dobosz E, Bryzek D, Chruścicka-Smaga B, Greczan M, Wesół-Kucharska D, Piatosa B Prof, Samborowska E, Madzio J, Książek J, Vel Emczyńska E, Hajdacka M, Potempa J, Młynarski W, Rokicki D, Veillard F.

Blood Adv. 2024 Mar 26: blood advances.2023012403. doi: 10.1182/ bloodadvances. 2023 012403. PMID: 38531056.

Impact factor: 7.5

Cel pracy: Celem pracy jest prospektywna ocena zarówno natychmiastowej, jak i długoterminowej skuteczności empagliflozyny (EMPA) w leczeniu neutropenii u pacjentów z GSD 1b.

Oceniono wpływ EMPA na najważniejsze funkcje przeciwdrobnoustrojowe granulocytów obojętnochłonnych, tj. apoptozę, fagocytozę, chemotaksję, wybuch tlenowy, komórkowe i osoczowe poziomy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) i LL-37 oraz tworzenie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) w porównaniu do kontrolnego leczenia czynnikiem wzrostu kolonii granulocytów obojętnochłonnych (G-CSF).

Material i metody: Spośród 12 pacjentów włączonych do badania klinicznego pt. „Ocena skuteczności i bezpieczeństwa empagliflozyny w leczeniu neutropenii u pacjentów z glikogenezą 1b” akronim EMPAtia. Do dodatkowej pogłębionej analizy poszczególnych funkcji przeciwdrobnoustrojowych neutrofilów zakwalifikowano 7 pacjentów (3 dziewczynki i 4 chłopcy w wieku 3- 19 lat; mediana wieku: 11 lat).

Pierwsza tak szczegółowa, prospektywna analiza była możliwa dzięki współpracy z projektem FixNet (*Fix Neutropenia: focusing on neutrophil proteases defects which serve as novel diagnostic and therapeutic options*) i przebiegała zgodnie z protokołem podbadania EMPAtia/ FixNet.

Przed włączeniem do badania wszyscy pacjenci byli leczeni G-CSF (mediana dawki: 2 ug/kg/dobę; zakres: 1-6.5 ug/kg/dobę). Neutrofile z krwi obwodowej u każdego pacjenta były wyizolowane przed włączeniem leczenia EMPA (mediana dawki: 0.42 mg/kg/dobę; zakres 0.3-0.47mg/kg/dobę), a następnie po 3 i 12 miesiącach. W każdej z próbek oceniono liczbę neutrofilów, ich zdolność do apoptozy, a także fagocytozę, chemotaksję, wybuch tlenowy, poziomy komórkowych i osoczowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) i LL-37 oraz tworzenie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET). Następnie porównano uzyskane wyniki u każdego pacjenta przed włączeniem EMPA, do wyniku po 3 i 12 miesiącach, a także do wartości prawidłowych (równoczesne oznaczenie powyższych parametrów u zdrowej kontroli). Zwrócono uwagę na przebieg kliniczny ze szczególnym uwzględnieniem liczby infekcji wymagających antybiotykoterapii i wystąpienia/ nasilenia choroby zapalnej jelit (IBD) (w okresie rok przed vs po włączeniu EMPA). Dodatkowo, w każdym z wymienionych punktów czasowych wykonano pomiar stężenia 1,5 anhydroglucitolu (1,5 AG) w surowicy i skorelowano go z uzyskanymi wynikami.

Wyniki: W trakcie leczenia G-CSF mediana liczby neutrofilii u 7 pacjentów wynosiła 0.86×10^3 kom/ μ l, co potwierdziło znaczny ich niedobór w stosunku do wartości należnych (mediana liczby neutrofilii zdrowej kontroli wynosiła $3,1 \times 10^3$ kom/ μ l). Po włączeniu EMPA mediana liczby neutrofilii po 3 miesiącach wzrosła do 1.95×10^3 kom/ μ l i po 12 miesiącach do 2.24×10^3 kom/ μ l. Możliwa była także stopniowa redukcja dawki G-CSF do 12. miesiąca trwania badania, udało się go bezpiecznie odstawić u 6/7 pacjentów, a u jednego zredukować dawkę o 50%. Po roku stosowania EMPA zaobserwowano zmniejszenie liczby infekcji wymagających antybiotykoterapii u 6/7 pacjentów (mediana liczby infekcji rok przed włączeniem EMPA do rok po, wynosiła 3 vs 1). Jeden pacjent przed włączeniem do badania miał rozpoznaną chorobę zapalną jelit (IBD), przez rok stosowania EMPA nie obserwowano nasilenia jej objawów. Ponadto żaden inny pacjent nie rozwinął tego powikłania. W trakcie analizy poszczególnych funkcji przeciwdrobnoustrojowych neutrofilii wykazano:

1) Odsetek żywotnych neutrofilii różnił się znacznie podczas leczenia G-CSF mediana: 34,8%. Po 3 i 12 miesiącach stosowania EMPA odsetek ten wzrósł do 61,7% i 67,8%. Efekt był bardzo zróżnicowany, znaczna poprawa była obserwowana jedynie u pacjentów z najniższą żywotnością początkową.

2) Ruchliwość neutrofilii od pacjentów otrzymujących G-CSF była upośledzona w porównaniu do tych komórek od zdrowych dawców (mediana: 192 vs 1010 migrujących komórek; $P < 0,001$). Po 12 miesiącach leczenia EMPA, mediana ruchliwości wzrosła u 7/7 pacjentów, ale nadal pozostawała niższa niż u zdrowej kontroli.

3) Odpowiedź chemotaktyczna była niewystarczająca u chorych otrzymujących G-CSF w porównaniu do neutrofilii od zdrowych dawców (1421 vs 2487 migrujących komórek, $P = 0,345$). Po 12 miesiącach leczenia EMPA mediana odpowiedzi chemotaktycznej neutrofilii u wszystkich pacjentów została przywrócona do poziomu obserwowanego u zdrowych dawców.

4) W trakcie leczenia G-CSF wykryto nieprawidłowy wybuch tlenowy u jednego chorego, co zostało skorygowane przez EMPA. Późniejsze odstawienie G-CSF nie wpłynęło na wybuch tlenowy negatywnie u żadnego chorego.

5) Mediana aktywności fagocytarnej od pacjentów leczonych G-CSF była znacznie niższa w porównaniu do zdrowych dawców (1546 vs 3735 jednostek fluorescencji). Po 12 miesiącach

leczenia EMPA mediana aktywności fagocytarnej znacznie wzrosła nie osiągając jednak wartości prawidłowych.

6) U pacjentów leczonych G-CSF zidentyfikowano gorsze tworzenie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych tzw. NETozy w porównaniu do zdrowych dawców. Leczenie EMPA spowodowało znaczny wzrost NETozy, jednak nie do poziomu obserwowanego w neutrofilach zdrowych dawców.

7) Leczenie EMPA zmniejszyło stężenie wewnątrzkomórkowych i osoczowych defensyn oraz LTF (AMPs) w porównaniu do leczenia G-CSF. Jednakże ani G-CSF, ani EMPA nie przywróciły prawidłowej produkcji AMPs.

8) Wykazano odwrotną korelację między stężeniem 1,5-AG w osoczu, a liczbą neutrofilów, ich odpowiedzią chemotaktyczną, fagocytozą i NETożą.

Wnioski: Neutrofile od pacjentów z GSD 1b, pomimo leczenia G-CSF, miały obniżoną liczbę, wskaźnik apoptozy, niższą ruchliwość, słabszą odpowiedź chemotaktyczną, nieskuteczną aktywność fagocytarną i upośledzoną produkcję NET i AMPs. Włączenie EMPA wpłynęło korzystnie na wszystkie powyższe parametry. Jednak, z wyjątkiem aktywności chemotaktycznej, EMPA nie przywróciła ani liczby neutrofilów, ani ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej do wartości obserwowanych u zdrowej kontroli. To dowodzi, iż poza toksycznym działaniem 1,5-AG istnieją dodatkowe mechanizmy uszkodzające neutrofile u pacjentów z GSD 1b.

3.4. Clinical characteristics and long-term outcomes of patients with glycogen storage disease type 1b: a retrospective multi-center experience in Poland

Magdalena Kaczor, Dorota Wesół- Kucharska, Milena Greczan, Karolina Kierus, Łukasz Kałużny, Monika Duś- Żuchowska, Ewa Ehmke vel Emczyńska, Elżbieta Ciara, Dariusz Rokicki, Janusz Książek.

Pediatr Endocrinol Diabetes Metab. 2022;28(3):207-212. doi: 10.5114/pedm.2022.116115. PMID: 35620924; PMCID: PMC10214975.

Punkty MNiSW: 70.00

Cel pracy: Celem pracy była retrospektywna analiza obrazu klinicznego i wyników leczenia pacjentów pediatrycznych z glikogenezą typu 1b (GSD 1b) w Polsce.

Material i metody: Analizą retrospektywną objęto 13 dzieci z rozpoznaną GSD1b (5 dziewczynek i 7 chłopców, których mediana wieku wynosiła 9 lat; zakres 2-17 r.ż). W 2021 roku liczba ta stanowiła 100% chorych dzieci, którzy na terenie Polski mieli postawione to rozpoznanie. Przeanalizowano historię choroby każdego pacjenta, zwracając szczególną uwagę na: pierwsze objawy, wiek ich wystąpienia, nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych, powikłania GSD1b (rodzaj, nasilenie i wiek wystąpienia), a także sposób i skuteczność ich leczenia. Podjęto także próbę skorelowania genotypu z fenotypem.

Wyniki: U 10/13 pacjentów pierwszym objawem GSD 1b była ciężkie zakażenie (sepsa lub wymagające leczenia szpitalnego zapalenie płuc), które obserwowano już w okresie noworodkowo-niemowlęcym (mediana wieku: 20 dni życia; zakres: pierwsza doba – 21./12. miesiąc). U wszystkich pacjentów obserwowana była hepatomegalia, która była raportowana w dokumentacji medycznej od mediany wieku 4 miesiący życia (zakres: 9. doba życia – 9. miesiąc życia). Wbrew doniesieniom literaturowym jedynie u 4/13 pacjentów hepatomegalii towarzyszyła nefromegalia. Wydawałoby się fundamentalna dla rozpoznania GSD 1b tj. hipoglikemia była stwierdzona u 8/13 pacjentów przed postawieniem rozpoznania z czego jej objawy, wystąpiły jedynie u 4/8 pacjentów.

Najczęstszym (12/13 pacjentów) odchyleniem w badaniach laboratoryjnych w momencie postawienia rozpoznania (mediana wieku: 5. miesiąc życia) była hipermleczanemia (mediana stężenia kwasu mlekowego 55mg/dl; zakres: 26 – 126 mg/dl [norma: <19.8]) i hipertriglicerydemia (mediana stężenia triglicerydów: 531 mg/dl, zakres: 246 - 3181 mg/dl [norma <150 mg/dl]). Neutropenia (mediana stężenia neutrofilii: 200 kom/ μ l; zakres 20 – 954 kom/ μ l [norma do 4 r.ż. <1000 kom/ μ l, powyżej <1500 kom/ μ l]) występowała u 9/13 pacjentów (mediana: 200 kom/ μ l; zakres: 20 – 954 kom/ μ l). Hipertransaminazemia była stwierdzona u 8/ 13 pacjentów (maksymalna wartość AST: 628 IU/l; ALT: 515 IU/l). Najrzadziej (5/13 pacjentów) obserwowano hiperurykemię (mediana: 8 mg/dl, zakres: 7-8.3 mg/dl [norma zależna od wieku zwykle <7 mg/dl]).

U większości chorych (11/13) rozpoznanie postawiono na podstawie objawów klinicznych i biochemicznych potwierdzonym badaniem molekularnym. Najczęstszym wariantem była delecja c.1042_1043, która na dwóch allelach wystąpiła u 7/13 dzieci. Podjęto próbę porównania przebiegu klinicznego GSD 1b między chorymi z takim samym wariantem molekularnym, a także tych o odmiennym genotypie. Nie udało się ustalić korelacji genotyp-fenotyp.

Podstawą leczenia u wszystkich pacjentów była dieta bogatobiałkowa (powyżej 2g białka/kg) z ograniczeniem węglowodanów prostych (galaktozy i fruktozy). Wydłużenie przerw między posiłkami uzyskiwano dzięki podaży surowej skrobi kukurydzianej (średnio 1.2 g/kg masy ciała/posiłek), 2 chorych otrzymywało Glycosade bez powikłań.

Leczenia neutropenii czynnikiem wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF) wymagało 12/13 pacjentów, a mediana wieku włączenia wynosiła 22 miesiące życia (zakres: 4. miesiąc życia – 11. rok życia). Pomimo stosowania G-CSF u pacjentów nadal obserwowano znacznie częstsze i cięższe zakażenia niż w grupie ich zdrowych rówieśników. Ponadto często obserwowano afty jamy ustnej (5/12 pacjentów) i przewlekłe biegunki (6/12 pacjentów). Chorobę zapalną jelit na podstawie kolonoskopii (owrzodzenia odbytnicy, ale u jednego pacjenta sięgające do okrężnicy) rozpoznano u 6/13 pacjentów, a mesalazynę doustnie włączono w wieku mediana: 5.5. roku życia, zakres: 2.5. – 9. rok życia. U dwóch pacjentów (w wieku 4. i 4.5. rok życia) rozpoznano nadciśnienie tętnicze wymagające leczenia farmakologicznego, ale bez innych cech uszkodzenia nerek. W trakcie obserwacji u czterech chorych stwierdzono otyłość (masa ciała >97pc), a u dwóch wysokość ciała poniżej 3pc.

Wnioski: Polska populacja pacjentów z GSD 1b jest wysoce heterogenna. Najistotniejsze wydaje się zwrócenie uwagi na często bezobjawowy przebieg hipoglikemii, a więc konieczność jej aktywnego poszukiwania (oznaczenie glikemii na czczo, przeprowadzenie testu przedłużonego głodzenia). Ponadto leczenie G-CSF nie jest w pełni skuteczne w zapobieganiu częstym i ciężkim zakażeniom, a dodatkowo wiąże się z wieloma działaniami niepożądanymi, m.in. bólem w miejscu wkłucia (12/12 pacjentów), bólem mięśniowo-stawowym (11/12), splenomegalią (9/12), krwawieniem z nosa (3/12) i wzrostem ryzyka nowotworów układu chłonnego (0/12).

4. Cele pracy

Celem pierwszorzędowym pracy było porównanie skuteczności leczenia czynnikiem wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF) do empagliflozyny (EMPA) w leczeniu neutropenii spowodowanej GSD 1b.

Celem drugorzędowym było scharakteryzowanie populacji polskich dzieci chorych na GSD 1b. Zwrócono szczególną uwagę na pierwsze najbardziej charakterystyczne objawy kliniczne, biochemiczne i występujące powikłania.

5. Analiza i interpretacja wyników badań

Powyżej przedstawione publikacje dowodzą, iż EMPA korzystnie wpływa na funkcjonowanie neutrofilii i nie powoduje istotnych działań niepożądanych u chorych z GSD 1b.

Opis mechanizmu działania EMPA został szczegółowo przedstawiony w artykule nr 1. Podsumowano w nim także wszystkie opublikowane do roku 2022, międzynarodowe doświadczenia dotyczące: dawkowania, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania takiego leczenia.

W artykule nr 2 porównano okres leczenia G-CSF do tożsamesgo okresu stosowania EMPA, zaobserwowano istotny spadek liczby zakażeń, ich ciężkości, a także zmniejszenie nasilenia objawów choroby zapalnej jelit. Tej istotnej poprawie klinicznej towarzyszył jedynie nieznaczny wzrost mediany liczby neutrofilii co utrudniało udowodnienie skuteczności tego leczenia.

Dopiero współpraca z projektem Fix-Net, pozwoliła na szczegółowe przeanalizowanie w artykule nr 3, podstawowych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowych neutrofilii w GSD 1b takich jak: żywotność, ruchliwość, wybuch tlenowy, chemotaksja, fagocytoza, NET-oza, stężenie AMPs, zarówno w trakcie leczenia G-CSF jak i EMPA. Porównanie wyników jednoznacznie udowodniło poprawę większości funkcji przeciwdrobnoustrojowych neutrofilii w trakcie leczenia EMPA u każdego z badanych chorych. Jednak oprócz aktywności chemotaktycznej, oceniane parametry były niższe niż obserwowane u zdrowych osób.

Ponadto wykazano odwrotną korelację między stężeniem 1,5-AG w osoczu, a liczbą neutrofilii, ich odpowiedzią chemotaktyczną, fagocytozą i NETozą. To potwierdza istotne znaczenie 1,5 AG, w etiologii neutropenii w GSD 1b.

Podsumowanie w artykule nr 4, przebiegu klinicznego chorych dzieci z GSD 1b zwraca uwagę na fakt, że najczęstszym pierwszym objawem choroby było ciężkie zakażenie i/ lub hepatomegalia, a nie jak wynika z patomechanizmu choroby, objawy hipoglikemii.

6. Dyskusja

Wnioski z artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej są spójne z dostępnymi publikacjami o skuteczności EMPA w profilaktyce przeciwdrobnoustrojowej u chorych z GSD 1b i braku istotnych działań niepożądanych (4)(5)(6)(7)(8).

W porównaniu do innych prac związanych z tą tematyką po raz pierwszy przeprowadzono tak szczegółową analizę aktywności przeciwdrobnoustrojowych neutrofilii. Udowodniła ona postulowaną wcześniej, na podstawie obserwacji klinicznych, niesatysfakcjonującą skuteczność leczenia G-CSF u chorych z GSD 1b. Porównanie poszczególnych funkcji neutrofilowych w trakcie leczenia G-CSF i EMPA, wykazało przewagę EMPA w profilaktyce zakażeń. Całokształt obserwacji klinicznej, doniesień literaturowych i powyższe wyniki badań dają podstawy do zmiany zaleceń leczenia neutropenii w przebiegu GSD 1b (4)(5)(6)(7)(8). Wydaje się, iż najwłaściwszym będzie leczenie wszystkich chorych z GSD 1b EMPA zamiast G-CSF (8). Takie postępowanie z jednej strony zwiększy odporność przeciw drobnoustrojom, z drugiej uchroni chorych przed wystąpieniem działań niepożądanych G-CSF.

Należy zwrócić uwagę, że w trakcie leczenia EMPA wzrosły wszystkie oceniane parametry z wyjątkiem syntezy AMPs, których stężenie było wyższe w trakcie leczenia G-CSF. AMPs m.in. defensyny to grupy peptydów odpornościowych o dużej aktywności przeciwwzakaźnej (9). Działają one nie tylko bezpośrednio, ale także pośrednio na drobnoustroje, poprzez transdukcję sygnałów i regulację szlaków zapalnych, wywołując aktywację układu odpornościowego (9). Synteza AMPs zachodzi w neutrofilach, komórkach nabłonka (głównie przewodu pokarmowego) i keratynocytach (9). Dlatego zasadnym wydaje się u chorych z GSD 1b, w trakcie leczenia zakażenia lub nasilenia objawów jelitowych, dołączenie G-CSF do przewlekle stosowanej EMPA. Włączenie G-CSF jedynie doraźnie pozwoli na zminimalizowanie jego działań niepożądanych.

Pomimo korzystnego wpływu EMPA na liczbę neutrofilii i większość ich funkcji, u badanych chorych nie uzyskano ich całkowitej normalizacji. Dlatego konieczna jest kontynuacja badań, w celu zidentyfikowania dodatkowych mechanizmów powodujących dysfunkcję granulocytów obojętnochłonnych w przebiegu GSD 1b.

Ograniczeniem niniejszej pracy jest mała populacja chorych i jej znaczna heterogenność pod względem wieku i obserwowanego przebiegu klinicznego. Według naszej wiedzy w Polsce jest 13 chorych dzieci na GSD 1b, w artykule nr 4 uwzględniono 100% tej

populacji. Niestety do badań funkcjonalnych neutrofilii nie udało się włączyć wszystkich chorych m.in. ze względu na brak zgody rodziców na pobranie dodatkowej objętości krwi. Niewątpliwie, zwiększenie wartości prowadzonych badań można by uzyskać włączając placebo u części chorych. Jednak wobec obiecujących doniesień o skuteczności EMPA i braku istotnych działań niepożądanych, takie postępowanie można byłoby uznać za nieetyczne.

7. Wnioski

1) W polskiej populacji pediatrycznej najczęstszym, pierwszym objawem GSD 1b jest ciężkie zakażenie w okresie noworodkowo-niemowlęcym. Jak i w wielu wrodzonych neutropeniach, tak i w przebiegu GSD 1b w trakcie trwania zakażenia szpik kostny jest zdolny do „wyrzucenia” większej liczby neutrofilii, co może maskować przewlekły niedobór tych komórek. Dlatego szczególnie w razie występowania nawracających, ciężkich zakażeń i/ lub podejrzenia GSD 1b, konieczna jest kontrola morfologii krwi z rozmazem ręcznym po ustąpieniu objawów infekcji i/ lub normalizacji CRP.

2) Hipoglikemia w przebiegu GSD 1b, pomimo znacznego nasilenia, stosunkowo rzadko daje objawy, co dowodzi konieczności jej aktywnego poszukiwania (oznaczenie glikemii na czczo, wykonanie testu przedłużonego głodzenia) u chorego diagnozowanego w tym kierunku.

3) Stosowanie G-CSF w leczeniu neutropenii u chorych na GSD 1b nie przywraca ani prawidłowej liczby, ani aktywności przeciwdrobnoustrojowej neutrofilii.

4) Włączenie do leczenia EMPA korzystnie wpływa na częstość infekcji i objawy choroby zapalnej jelit, co jest głównie wynikiem poprawy funkcjonowania przeciwdrobnoustrojowego neutrofilii.

5) Stosowanie EMPA, pomimo jego działania hipoglikemizującego, jest bezpieczne u pacjentów z GSD 1b.

6) EMPA wpłynęła korzystnie na wszystkie parametry aktywności przeciwdrobnoustrojowej granulocytów obojętnochłonnych z wyjątkiem syntezy wewnątrzkomórkowych i osoczowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) m.in. defensyn. Wytwarzanie AMPs było większe w trakcie leczenia G- CSF.

8. Piśmiennictwo:

1. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE et al. American College of Medical Genetics and Genomics. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2014 Nov;16(11): e1. doi: 10.1038/gim.2014.128. PMID: 25356975.
2. Takao MMV, Sandy NS, Riccetto AGL et al. LONG TERM MANAGEMENT OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 1B: A BRAZILIAN TERTIARY CENTER EXPERIENCE. *Arq Gastroenterol*. 2021 Jan-Mar;58(1):87-92. doi: 10.1590/S0004-2803.202100000-15. PMID: 33909803.
3. Visser G, Rake JP, Labrune P et al. European Study on Glycogen Storage Disease Type I. Consensus guidelines for management of glycogen storage disease type 1b - European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S120-3. doi: 10.1007/s00431-002-1017-6. Epub 2002 Sep 13. PMID: 12373585.
4. Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stephenne X et al. Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jan 22;116(4):1241-1250. doi: 10.1073/pnas.1816143116. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30626647; PMCID: PMC6347702.
5. Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TG Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib with an SGLT2 inhibitor. *Blood*. 2020 Aug 27;136(9):1033-1043. doi: 10.1182/blood.2019004465. PMID: 32294159; PMCID: PMC7530374.
6. Hexner-Erlichman Z, Veiga-da-Cunha M, Zehavi Y, et al. Favorable outcome of empagliflozin treatment in two pediatric glycogen storage disease type 1b patients. *Front Pediatr*. 2022 Nov 23;10:1071464. doi: 10.3389/fped.2022.1071464. PMID: 36507137; PMCID: PMC9727171.
7. Grünert SC, Derks TGJ, Adrian K, et al. Efficacy and safety of empagliflozin in glycogen storage disease type Ib: Data from an international questionnaire. *Genet Med*. 2022 Aug;24(8):1781-1788. doi: 10.1016/j.gim.2022.04.001. Epub 2022 May 3. PMID: 35503103.

8. Grünert SC, Derks TGJ, Adrian K et al. Efficacy and safety of empagliflozin in glycogen storage disease type Ib: Data from an international questionnaire. *Genet Med.* 2022 Aug;24(8):1781-1788. doi: 10.1016/j.gim.2022.04.001. Epub 2022 May 3. PMID: 35503103.
9. Deptuła, J., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła W., et al. Defensyny u ludzi i zwierząt. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 73, 152-158. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.1135>

9. Załączniki

9.1. Publikacja nr 1.....	28
9.2. Publikacja nr 2.....	32
9.3. Publikacja nr 3.....	40
9.4. Publikacja nr 4.....	70
9.5. Oświadczenia współautorów.....	76

Przełom w leczeniu glikogenozy 1b?

lek. Magdalena Kaczor, lek. Dorota Wesół- Kucharska, Milena Greczan,
prof. dr. hab.n. med. Janusz Książczyk, dr. n. med. Dariusz Rokicki

z Kliniki Pediatrii, Żywienia i Chorób Metabolicznych Instytutu „Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka”
w Warszawie
p.o. Kierownika Kliniki: dr. n. med. Dariusz Rokicki

Streszczenie:

Glikogenoza 1b (GSD 1b) jest rzadką, wrodzoną wadą metabolizmu węglowodanów, spowodowaną deficytem białka transportującego glukozo-6-fosforan (G6P) przez błonę retikulum endoplazmatycznego (RE). Choroba dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny, a potwierdzeniem rozpoznania jest bialleliczny defekt genu *SLC37A4*.

W okresie niemowlęcym ujawniają się pierwsze objawy GSD 1b, do których należą: niedobór wzrastania, tzw. „twarz lalki”, masywna hepatomegalia czy zagrażające życiu zakażenia. Charakterystyczne dla GSD 1b odchylenia w badaniach laboratoryjnych to: hipoglikemia ketotyczna, hipermlęczanemia, hipertriglicerydemia, hipercholesterolemia, hiperaminotranferazemia, hiperurykemia i neutropenia. W USG jamy brzusznej oprócz powiększenia wątroby często zwraca uwagę wzmożona echogeniczność jej mięszu i renomegalia.

Podstawą leczenia GSD 1b jest leczenie żywieniowe oparte na częstej podaży zbilansowanych posiłków, które zawierają znikome ilości galaktozy i fruktozy. Wydłużanie przerw między posiłkami uzyskuje się dzięki polimerowi glukozy – surowej skrobi kukurydzianej. W zapobieganiu zagrażającym życiu zakażeniom stosuje się czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), który jednak ich nie eliminuje, a ma liczne działania niepożądane.

Według ostatnich doniesień, neutropenia u pacjentów z GSD 1b spowodowana jest kumulacją w cytoplazmie neutrofilii fosforanu 1,5-anhydroglucitolu (1,5 AG6P), który zaburzając produkcję energii prowadzi do ich przedwczesnej apoptozy. Badania nad inhibitorem kotransportera sodowo-glukozowego typu 2 (SGLT2) – empagliflozyną ujawniły, iż oprócz znanego działania hipoglikemizującego, powoduje ona zmniejszenie w surowicy krwi 1,5-anhydroglucitolu (substratu dla 1,5 AG6P). U pacjentów z GSD 1b obniżenie stężenia 1,5 AG6P, prowadzi do dłuższego przeżycia i poprawy funkcjonowania przeciwdrobnoustrojowego neutrofilii, czyli mniejszej liczby i ciężkości zakażeń. Wstępne wyniki leczenia empagliflozyną pacjentów z GSD1b są obiecujące, a być może nawet przełomowe.

Słowa kluczowe: Glikogenoza 1b, neutropenia, *SLC37A4*, 1,5-anhydroglucitol, empagliflozyna

Glikogenoza typu 1b (GSD 1b, MIM #232220) jest rzadką (1: 500 000 żywych urodzeń) wrodzoną wadą metabolizmu węglowodanów, w której zaburzona jest zarówno degradacja glikogenu (glikogenoliza) jak i synteza glukozy (glukoneogeneza). U jej podłoża leży deficyt białka transportującego glukozo-6-fosforan (G6P) przez błonę retikulum endoplazmatycznego (1).

GSD 1b to najcięższa, spośród szesnastu typów wyróżnianych w grupie chorób spichrzania glikogenu tzw. glikogenozami. Dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny, a potwierdzeniem rozpoznania jest bialleliczny defekt genu *SLC37A4* (1).

Objawy glikogenozy typu 1b (GSD 1b)

Pierwsze objawy GSD 1b ujawniają się już w okresie niemowlęcym. Charakterystyczna jest poposiłkowa hipoglikemia (2-4 godziny od posiłku), która nie odpowiada na leczenie glukagonem. Pomimo, iż w przebiegu GSD 1b obserwujemy spadki stężenia glukozy w surowicy krwi znacznie poniżej 40 mg/dl, niezmiernie rzadko prowadzą one do zaburzeń zachowania, splątania czy drgawek. Fakt ten tłumaczy się kompensacyjną produkcją mleczanów i ketonów, które są zużywane jako zastępcze źródło energii i dodatkowo ochronnym działaniem, charakterystycznego dla pierwszego półrocza życia, częstego rytmu karmień.

Zwykle pierwszymi zwracającymi uwagę objawami są: masywna hepatomegalia, zahamowanie przyrostu masy ciała

i charakterystyczna twarz z wydatnymi policzkami (tzw. „twarz lalki”). W badaniach laboratoryjnych dominuje hipermlęczanemia, hipertriglicerydemia (nierzadko >1000 mg/dl), hipercholesterolemia, hiperaminotranferazemia i hiperurykemia (często pojawia się dopiero w późniejszym okresie życia) (1). Po podaży glukozy obserwuje się obniżenie stężenia mleczanów w surowicy stąd przydatność „testu dożylnego obciążenia glukozą” (tzw. VGTT) w postawieniu rozpoznania.

Badanie USG jamy brzusznej oprócz znacznego powiększenia wątroby, uwidacznia zaburzenia echostruktury jej mięszu (jak w masywnym stłuszczeniu), a także powiększenie nerek (1).

W przebiegu GSD 1b obserwuje się zagrażające życiu zakażenia, nawracające afte jamy ustnej i uporczywe biegunki (*Crohn-like disease*) co spowodowane jest obniżoną liczbą i aktywnością przeciwdrobnoustrojową neutrofilii (1). Wśród pacjentów pozostających pod opieką naszego ośrodka najczęściej pierwszym objawem choroby, zwykle już w okresie noworodkowym, było zagrażające życiu zakażenie, dopiero w kolejnych miesiącach obserwowano hipoglikemię i hepato-/nefromegalię.

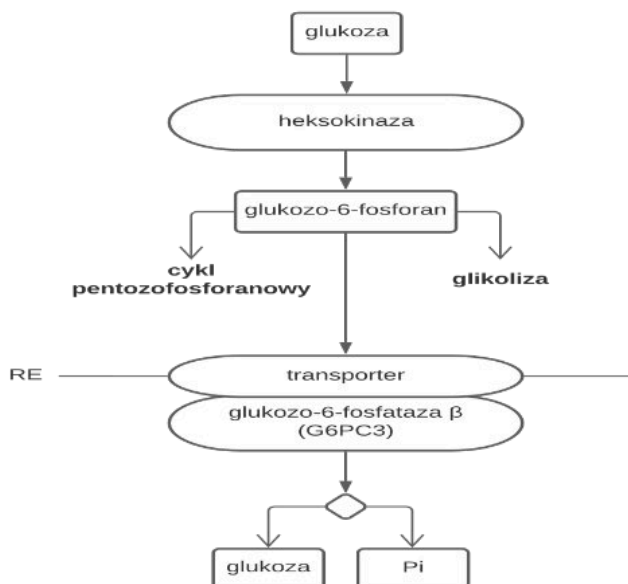
Dodatkowo w GSD 1b mogą pojawić się (szczególnie w razie złej kontroli choroby): zaburzenia elektrolitowe wynikające z uszkodzenia cewki proksymalnej nefronu (zespół Fanconiego), zaburzenia krzepnięcia (dysfunkcja płytek krwi i/lub nieprawidłowe funkcjonowanie czynnika von Willebrandta), czy oporna na leczenie niedokrwistość (o złożonej etiologii).

Ostateczne rozpoznanie stawiane jest na podstawie badań molekularnych potwierdzających bialleliczny defekt genu *SLC37A4*, niezwykle rzadko wykorzystuje się w tym celu badania enzymatyczne.

GSD 1b jest chorobą prowadzącą do wielonarządowych powikłań. W wątrobie, pomimo dobrej kontroli choroby, często obserwuje się zmiany ogniskowe o charakterze gruczolaków, które wymagają częstej kontroli ze względu na ryzyko nowotworzenia. Postępujące spichrzanie glikogenu i lipidów w nerkach początkowo powoduje uszkodzenie cewki proksymalnej i dystalnej (hipocytraturia, hiperkalciuria, co wiąże się z ryzykiem kamicy układu moczowego), a z czasem może prowadzić do rozwoju przewlekłej choroby nerek (hiperfiltracja kłębuszkowa, szkliwienie kłębuszków, albuminuria, nadciśnienie tętnicze). Ponadto obserwuje się częściej niż w populacji ogólnej: osteoporozę, hipogonadyzm hipogonadotropowy, zespół policystycznych jajników, zaburzenia wzrastania, autoimmunologiczną niedoczynność tarczycy czy *miasthenia gravis* (1).

Biochemia GSD 1b

Uzyskiwany z rozkładu glikogenu glukoza-6-fosforan (G6P) fizjologicznie jest hydrolizowany przez glukoza-6-fosfatazę wewnątrz RE do glukozy, która jest następnie uwalniana z komórki i wykorzystana do utrzymania normoglikemii w okresie międzyposiłkowym. Aby mogło dojść do tej reakcji, G6P musi zostać przeniesiony z cytoplazmy komórki do wnętrza RE za pośrednictwem swojego transportera. Dlatego deficyt transportera dla G6P powoduje upośledzone powstawanie glukozy, a także nadmierne stężenie G6P w cytoplazmie komórki. G6P jest metabolitem pośrednim glikolizy, cyklu Krebsa, lipogenezy i cyklu pentozofosforanowego, dla-



Rycina 1. Dojrzały neutrofil (produkcja energii – glikoliza i wolnych rodników tlenowych – cykl pentozofosforanowy).

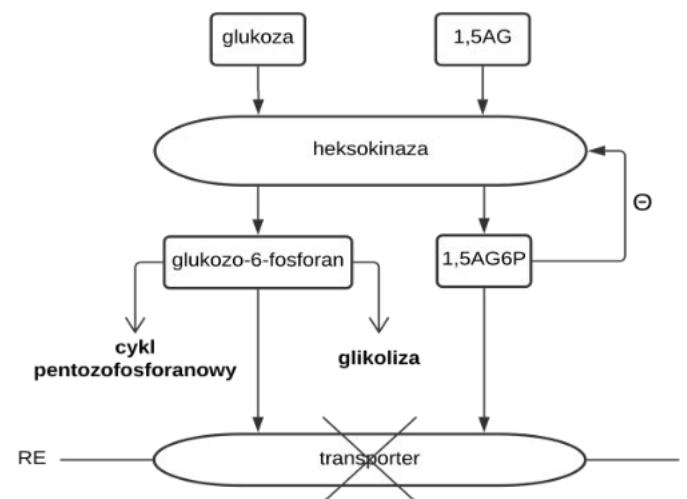
tego jego zwiększona ilość prowadzi do nadmiernej stymulacji tych procesów, prowadząc do typowych dla GSD 1b nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych (hipermleczanemii, hipertriglicerydemii i hiperurykemii itd.) (1). Dodatkowo nieprawidłowo rozkładany glikogen i nadmiar lipidów są magazynowane w wątrobie i nerkach co prowadzi do ich powiększenia i zaburzeń w funkcjonowaniu (1).

Defekt transportera dla G6P jest obecny także w neutrofilach, w których prowadzi do ich przedwczesnej apoptozy i zaburza ich aktywność bakterio- i grzybobójczą. U pacjentów z GSD 1b obserwuje się także większą częstotliwość autoimmunizacji, ale mechanizm tego zjawiska nie jest do końca poznany. W trakcie badań nad homeostazą komórek odpornościowych w tej grupie chorych, zaobserwowano częstsze występowanie limfopenii, zmniejszoną aktywność supresyjną limfocytów T regulatorowych (CD4+ CD25+ FOXP3+) i zmniejszoną zdolność limfocytów T regulatorowych do hamowania produkcji cytokin (3).

Leczenie glikogenozy 1b

Podstawą leczenia GSD 1b jest leczenie żywieniowe oparte na częstej (zwykle co 3-4 godziny w dzień i co 4-5 godziny w nocy) podaży zbilansowanych posiłków, które zawierają znikome ilości galaktozy i fruktozy. Cukry te, ze względu na opisany powyżej deficyt transportera dla G6P, nie mogą być prawidłowo włączane w szlaki metaboliczne, a co za tym idzie, nasilają m.in. kwasicę mleczanową (1).

Wydłużenie przerw między posiłkami, zwłaszcza w nocy, uzyskuje się dzięki podaży surowej skrobi kukurydzianej (SSK). Jest to polimer składający się z cząsteczek glukozy, których powolne uwalnianie umożliwia utrzymanie prawidłowej glikemii przez dłuższy czas (1).



Rycina 2. Neutrofil pacjenta z GSD 1b (1,5 AG6P hamując zwrótnie heksokinazę zmniejsza stężenie substratu dla produkcji energii i wolnych rodników tlenowych odpowiedzialnych za aktywność bakterio- i grzybobójczą).

Tabela 1. Podsumowanie piśmiennictwa (4) (5) (6) (7) – przebieg kliniczny przed i po włączeniu do leczenia empagliflozyny.

Wiek (lata)	Płeć	Objawy bezpośrednio przed EMPA	Dawka G-CSF przed EMPA	Dawka EMPA/ Dawka G- CSF	Efekt leczenia EMPA (dni od włączenia EMPA)
21	K	- nawracające afty jamy ustnej i okolicy moczowo-płciowej, - częste zakażenia - 20 wodnistych stolców/dobę - CDAI* 221 pkt	10 µg/kg/24h	0.4 mg/ kg/24h odstawiono	Zagojenie większości zmian (5 dni) 1-2 stolce/dobę (7 dni) CDAI * 138 pkt (12 dni)
2	K	- przewlekłe afty jamy ustnej i okolicy moczowo-płciowej - niedokrwistość	10 µg/kg/24h	0.3 mg/kg/24h odstawiono	Zagojenie zmian Ustąpienie niedokrwistości
6	M	- przewlekłe zapalenie dziąseł - nawracające zakażenia układu oddechowego - 5-9 wodnistych stolców/dobę - ciężka niedokrwistość - PCDAI * 67.5	7 µg/kg/24h	0.7 mg/kg/24h zmniejszenie dawki o 81%	Zagojenie stanu zapalnego dziąseł Zmniejszenie liczby i poprawa konsystencji stolców (12 dni) Umiarkowana niedokrwistość PCDAI* 17.5 (60 dni)
2	K	- nawracające owrzodzenia jamy ustnej - ropień/utrzymujący się stan zapalny okolicy gastrostomii - 8 wodnistych stolców/dobę	2.4 µg/kg/24h	0.5 mg/kg/24h zmniejszenie dawki o 57%	Zagojenie zmian skórnych i śluzówkowych 2 stolce/dobę o prawidłowej konsystencji
14	M	- ból brzucha - 2-5 wodnistych stolców/dobę - szczelina odbytu - PCDAI* 50 - MRI (pogrubienie ściany jelita) - Hist- pat: stan zapalny + ropnie w kryptach	4.8 µg/kg/24h	0.4 mg/kg/24h zmniejszenie dawki o 33%	Ustąpienie bólu brzucha i zagojenie się szczeliny odbytu (6 dni) - 1-2 stolce/ dobę (7 dni) - PCDAI* 5 (15 dni) - znaczna poprawa obrazu w MRI (3 msc) - Hist-pat: bez cech aktywnego stanu zapalnego (5,5 msc)
2,5	K	- nawracające ropnie skóry, płuc, jamy ustnej - Harvey-Bradshaw index** 3.36	5 µg/kg/24h	0.5 mg/kg/24h odstawiono	Harvey-Bradshaw index ** 1.23 (2 msc)
35	K	- niegojąca się przez 2 lata rana pooperacyjna w powłokach jamy brzusznej - 10-11 luźnych stolców/24h - CDAI 398	1 µg/kg/24h	20 mg/dobę odstawiono	Zagojenie (kilka tygodni) - 5- 7 stolców/24h - CDAI 184

Skale stosowane w ocenie aktywności choroby Crohna:

*CDAI – Crohn's Disease Activity Index; PCDAI – modyfikacja pediatryczna; **Harvey-Bradshaw index

W leczeniu neutropenii u pacjentów z GSD 1b stosowany jest G-CSF, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, który poprzez zwiększenie wyrzutu neutrofilii ze szpiku kostnego, zmniejsza liczbę i ciężkość zakażeń, jednak ich nie eliminuje. Pomimo stosowania G-CSF nadal obserwowane są częste, zagrażające życiu zakażenia, afty jamy ustnej, biegunki (*Crohn-like disease*) (1). Ponadto lek ten ma wiele działań niepożądanych wśród, których najczęściej obserwuje się bóle kostno-stawowe, przerost, krwawienie dziąseł, powiększenie śledziony z towarzyszącym hipersplenizmem, a także zwiększone ryzyko nowotworów układu krwiotwórczego (zespół mielodysplastyczny, ostra białaczka szpikowa) (1).

Mechanizm powstawania neutropenii w GSD 1b

Według opublikowanych badań (Veigha-da-Cunha et al.) obniżona ilość, a także nieprawidłowa funkcja neutrofilii u pacjentów z GSD 1b, spowodowana jest kumulacją w ich cytoplazmie fosforanu 1,5-anhydroglucitolu (1,5 AG6P), który hamując glikolizę beztlenową, utrudnia pozyskanie energii z glukozy (2). Neutrofile w trakcie dojrzewania tracą większość mitochondriów, a tym samym możliwość otrzymania energii z innych źródeł niż glikoliza beztlenowa (ryc. 1). Zahamowanie tego procesu przez 1,5 AG6P prowadzi do przedwczesnej apoptozy i upośledzenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej neutrofilii (ryc. 2) (2)(3).

1,5AG6P jest produktem fosforylacji 1,5-anhydroglucitolu (1,5AG), substancji nietoksycznej o niepoznanej dotychczas roli w metabolizmie człowieka, która jest dostarczana do ludzkiego organizmu głównie z pożywieniem (w 10% jest to produkcja endogenna w jelitach) (2). W warunkach fizjologicznych 1,5 AG jest fosforylowany przez heksokinazę do 1,5 AG6P i transportowany do reticulum endoplazmatycznego. W jego wnętrzu przekształcaną przez glukozo-6-fosfatazę do 1,5 AG i fosforanu, a następnie usuwany z komórki.

U pacjentów z GSD 1b, deficyt transportera powoduje akumulację 1,5 AG6P w cytoplazmie neutrofilii. Nadmiar 1,5 AG6P hamuje heksokinazę co utrudnia przekształcenie glukozy w glukozo-6-fosforan, a tym samym zmniejsza ilość substratu do produkcji energii i wolnych rodników tlenowych ryc. 2) (2).

Postuluje się także, iż zaburzona glikoliza może być także przyczyną obserwowanych odchyłań w funkcjonowaniu innych komórek układu odpornościowego, m.in. monocytów czy limfocytów T regulatorowych (3).

Empagliflozyna (EMPA) u pacjentów z GSD 1b

Empagliflozyna (EMPA) inhibitor nerkowego kotransportera sodowo-glukozowego typu 2 (SGLT2) hamuje resorpcję zwrotną glukozy z moczu pierwotnego, co prowadzi do zmniejszania jej stężenia w surowicy krwi. Lek ten z powodzeniem stosowany jest u dorosłych pacjentów z cukrzycą typu II, nasilając diurezę obniża ciśnienie krwi, dzięki czemu ma działanie kardio- i nefroprotektoryjne.

Ostatnio zaobserwowano, iż EMPA hamuje także wychwyt zwrotny 1,5 AG w kanalikach nerkowych. U pacjentów z GSD 1b obniżenie stężenia w surowicy 1,5 AG, odblokowuje glikolizę i cyklu pentozofosforanowy w neutrofilach, a tym samym prowadzi do dłuższego ich przeżycia i poprawy funkcjonowania przeciwdrobnoustrojowego (4).

Najczęściej obserwowanymi działaniami niepożądanymi takiego leczenia jest hipoglikemia (opisywana u pacjentów z cukrzycą typ II jedynie przy stosowaniu EMPA z innymi lekami hipoglikemizującymi) i większa częstość zakażeń układu moczowego (duże stężenie glukozy w moczu).

Dotychczas zastosowanie EMPA opisano u siedmiu pacjentów z GSD 1b (tab. 1). W pierwszej opisaną przez prof. S. Wortmann serii przypadków, po podaży EMPA u 4 pacjentów stwierdzono zmniejszenie częstości i ciężkości zakażeń, a także nasilenia objawów choroby zapalnej jelit (4). Ponadto u dwóch pacjentów było możliwe odstawienie G-CSF, a u dwóch zmniejszenie dawki odpowiednio o 57% i 81% (4). Do końca 2021 roku opublikowano jeszcze trzy opisy przypadków zastosowania takiego leczenia: u 35-letniej kobiety, 14-letniego chłopca i 2-letniej dziewczynki (5) (6) (7). We wszystkich przypadkach dzięki empagliflozynie, w krótkim czasie, uzyskano ustąpienie objawów ciężkiego zapalenia jelit (5) (6) (7) (tab. 1). Co najistotniejsze w żadnym z przytoczonych przypadków nie obserwowano częstszych spadków glikemii ani innych istotnych objawów niepożądanych (4) (5) (6) (7).

Podsumowanie

W ostatnich latach, za sprawą coraz większej wiedzy zarówno dotyczącej leczenia żywieniowego jak i farmakologicznego w GSD 1b, znacząco poprawiła się u pacjentów kontrola glikemii, a tym samym ich tzw. wyrównanie metaboliczne (normalizacja kwasu mlekowego, triglicerydów, aminotransferaz i kwasu moczowego). Aktualnie wydaje się, iż najbardziej dewastujące i pogarszające jakość życia w tej grupie chorych są powikłania neutropenii, a także paradoksalnie jej leczenie z zastosowaniem G-CSF. Najnowsze odkrycie o wpływie 1,5 anhydroglucitolu na neutrofile i zmniejszaniu jego stężenia dzięki empagliflozynie może okazać się przełomowym dla pacjentów z GSD 1b.

W najbliższym czasie rozpocznie się rekrutacja pacjentów z glikogenozą 1b do badania klinicznego pt. „Ocena skuteczności i bezpieczeństwa empagliflozyny w leczeniu neutropenii u pacjentów z glikogenozą 1b” akronim EMPAtia.

Zespół z „Instytutu – Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” pod przewodnictwem dr. Dariusza Rokickiego natchniony wykładem profesor Saskii Wortmann skonstruował od podstaw badanie kliniczne, które wygrało konkurs organizowany przez Agencję Badań Medycznych. Do badania będzie włączonych 20 pacjentów w tym, dzięki współpracy z Warszawskim Uniwersytem Medycznym, także dorosłych.









Zapraszamy do współpracy pacjentów (od ukończonego 4. tygodnia życia) z rozpoznaną biochemicznie i/lub molekularnie glikogenozą 1b. Z udziału w badaniu wyklucza przewlekła choroba nerek (gdy eGFR poniżej 60 ml/min/1,73 m²). Kontakt do Głównego Badacza: d.rokicki@ipczd.pl

Piśmiennictwo

- Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2014;16(11):e1.
- Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stephenne X, Defour JP, Paczia N, Ferster A, Achouri Y, Dewulf JP, Linster CL, Bommer GT, Van Schaftingen E. Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jan 22;116(4):1241-1250. doi: 10.1073/pnas.1816143116. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30626647; PMCID: PMC6347702.
- 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. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31705665.
- Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TGJ, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib with an SGLT2 inhibitor. *Blood*. 2020; 136(9):1033-1043.
- Grünert SC, Elling R, Maag B, et al. Improved inflammatory bowel disease, wound healing and normal oxidative burst under treatment with empagliflozin in glycogen storage disease type Ib. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15:218.
- Mikami M, Arai A, Mizumoto H. Empagliflozin ameliorated neutropenia in a girl with glycogen storage disease Ib. *Pediatr Int*. 2021 Nov;63(11):1394-1396. doi: 10.1111/ped.14629. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34378838.
- Rossi A, Miele E, Fecarotta S, Veiga-da-Cunha M, Martinelli M, Mollica C, D'Armiesto M, Mozzillo E, Strisciuglio P, Derks TGJ, Staiano A, Parenti G. Crohn disease-like enterocolitis remission after empagliflozin treatment in a child with glycogen storage disease type Ib: a case report. *Ital J Pediatr*. 2021 Jul 2;47(1):149. doi: 10.1186/s13052-021-01100-w. PMID: 34215305; PMCID: PMC8254289.

CASE REPORT

Sodium-glucose cotransporter type 2 channel inhibitor: Breakthrough in the treatment of neutropenia in patients with glycogen storage disease type 1b?

Magdalena Kaczor¹  | Milena Greczan¹  | Karolina Kierus² |
 Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga¹  | Elżbieta Ciara³  | Barbara Piątoś⁴  |
 Dariusz Rokicki¹  | Janusz Książyk¹  | Dorota Wesół-Kucharska¹ 

¹Department of Paediatrics, Nutrition and Metabolic Diseases, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

²Department of Paediatrics, Rheumatology, Immunology and Metabolic Bone Diseases, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³Department of Medical Genetics, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

⁴Histocompatibility Laboratory, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

Correspondence

Dorota Wesół-Kucharska, Department of Paediatrics, Nutrition and Metabolic Diseases, Children's Memorial Health Institute, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland.

Email: d.wesol-kucharska@ipczd.pl

Funding information

None.

Communicating Editor: Ivo Barić

Abstract

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is an inherited metabolic defect caused by biallelic mutations in the *SLC37A4* gene encoding microsomal glucose-6-phosphate (G6P) transporter in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Ineffective G6P transport into the ER leads to hypoglycaemia, hyperlactatemia, hyperuricemia, hypertriglyceridemia, hepato- and/or nephromegaly. Clinical manifestations of the disease include recurrent, severe infections and inflammatory bowel (Crohn-like) caused by neutropenia and diminished bactericidal and fungicidal activity of neutrophils. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration is currently a standard therapy to prevent adverse effects of neutropenia, but the treatment is associated with a high risk of severe side effects. On the other hand, short-treatment with sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitor – empagliflozin (EMPA) was reported to act directly on the mechanism of neutropenia and neutrophil dysfunction in GSD 1b. We observed significant improvement in clinical and laboratory parameters after introducing EMPA to treatment, that is reduced frequency of infections, lower number of bowel movements, and improved postoperative wound healing. EMPA is effective in the treatment of neutropenia in our GSD 1b patients, which allows for dose reduction and even withdrawal of G-CSF. We did not observe any significant side effects of EMPA treatment in our patients.

KEYWORDS

empagliflozin, G-CSF, GSD 1b, neutropenia, SGLT2 inhibitor

1 | INTRODUCTION

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is a rare (prevalence 1: 500 000) autosomal recessive metabolic defect

caused by biallelic mutations in the *SLC37A4* gene. It leads to a deficiency of microsomal glucose-6-phosphate (G6P) transporter in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. G6P hydrolysis to glucose is possible only inside

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *JIMD Reports* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of SSIEM.

ER. Therefore transporter absence/deficiency in ER results in hypoglycaemia.^{1,2} An increased G6P in cytoplasm results in excessive stimulation of metabolic processes, leading to laboratory abnormalities typical for GSD 1b (hyperlactatemia, hypertriglyceridemia, hyperuricemia, and hypercholesterolemia).¹⁻³ In addition, poorly metabolised glycogen and fats accumulate in the liver and kidneys, leading to their enlargement and dysfunction. Hepatic adenomas, abnormal proximal or distal renal tubule function, and progressive glomerular fibrosis were also observed.¹

Metabolic aberrancies in G6P transport also negatively affect neutrophil count and function. As a result, GSD 1b patients demonstrate an increased frequency of severe infections and predisposition to inflammatory bowel (Crohn-like) disease.¹⁻³ Premature apoptosis and reduced bactericidal and fungicidal activity of neutrophils in GSD 1b patients are caused by an excessive accumulation of 1,5 anhydroglucitol-6-phosphate (1,5 AG6P) in cell cytoplasm.^{2,3} 1,5 AG6P inhibits hexokinase and negatively affects the conversion of glucose into G6P, thereby reducing the amount of substrate for production of energy and free oxygen radicals.^{2,3}

The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment of neutropenia in patients with GSD 1b aims to improve the absolute neutrophil count and reduce the severity of infections. Unfortunately, pathological effects are not eliminated, and life-threatening infections are still observed, while inflammatory bowel disease is often poorly controlled.^{3,4} In addition, the ineffective elimination of toxic metabolites from neutrophils reduces G-CSF efficacy in GSD1b.²

Empagliflozin (EMPA), a renal sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2) inhibitor approved for the treatment of diabetes mellitus type 2, inhibits the reuptake of 1,5 anhydroglucitol (1,5 AG) in renal tubules.^{3,5} Lowering the serum concentration of 1,5 AG respectively reduces the concentration of 1,5 AG6P in the neutrophil cytoplasm. What in patients with GSD 1b leads to the unblocking of glycolysis and pentose phosphate cycle, thus prolonging the survival of the neutrophil and improving its function.^{3,5}

2 | AIM

The aim of this study is to describe the effects of EMPA treatment (3–18 months of treatment) in four patients with GSD 1b respect to clinical symptoms and laboratory parameters.

3 | MATERIAL AND METHODS

The study included four patients with GSD 1b, two girls and two boys, remaining under the combined care of the

Synopsis

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is an inherited metabolic defect caused by balletic mutations in the *SLC37A4* gene encoding microsomal glucose-6-phosphate transporter in the endoplasmic reticulum membrane. The main symptoms of the disease include short stature, hepatomegaly, hypoglycaemia, hyperlactatemia, hypertriglyceridemia, and neutropenia.

Neutropenia leads to severe infections and the development of inflammatory bowel disease despite G-CSF treatment.

We observed significant improvement in clinical and laboratory parameters after introducing empagliflozin to treatment without significant side effects.

Department of Paediatrics, Nutrition and Metabolic Diseases, Children's Memorial Health Institute (IP-CZD) in Warsaw and the Department of Paediatrics, Rheumatology, Immunology and Metabolic Bone Diseases, Medical University of Bialystok. Due to unsatisfactory improvement on G-CSF, we started treatment with EMPA. Clinical data and laboratory parameters in similar follow-up periods before and after the introduction of EMPA were retrospectively analysed to evaluate the effects of EMPA treatment.

The collected data included the number of urgent hospitalisations due to infection, the number of infections requiring antibiotic therapy, the mean number of stools per day, and the average number of days per month with mucosal lesion before and after the implementation of EMPA therapy. In addition, we evaluated the metabolic response by assessing the concentration of glucose, lactic acid, uric acid, and triglyceride in serum and by evaluating the absolute neutrophil count. Finally, results of all analysed parameters were compared for similar periods before and after introducing EMPA treatment.

4 | CASES DESCRIPTION

P1: Male patient, currently 17.5 years old, was born by Caesarean section from pregnancy G1 at 41 weeks, with Apgar score of 10 and birth weight of 3.800 g. Congenital pneumonia complicated the neonatal period. At 2 months of age, perirectal abscess drainage was required. Two weeks later, the patient developed a generalised infection of unknown aetiology. Hepatomegaly, hypoglycaemia of 1.7 mmol/L after a 3-h feeding break, and neutropenia (200 cells/ μ L,

N > 1000) were detected. Molecular testing revealed a homozygous *SLC37A4* variant, c.1042_1043del.

The boy was repeatedly hospitalised during several subsequent months due to hypoglycaemia, recurrent severe bacterial infections (pneumonia, bilateral otitis), episodes of stomatitis, and/or diarrhoea. Due to severe, persistent neutropenia (100–200 cells/ μ l, N > 1000), G-CSF at 5 μ g/kg/24 h dose was introduced to the therapy when the patient was 22 months old. By 16 years of age, the boy was hospitalised approximately 50 times due to recurrent bacterial infections, diarrhoea, mouth sores, and skin abscesses. Despite G-CSF treatment, no significant increase in the neutrophil count was achieved. At 3 years, the patient developed severe Crohn-like bowel disease and periodically required parenteral nutrition. At 16 years of age, the patient started zoledronic treatment due to significant thinning of bone structure and numerous vertebral compression fractures found in dual-photon X-ray absorptiometry (DXA).

Despite G-CSF and mesalazine, during the year preceding the introduction of EMPA, the patient demonstrated poor control of inflammatory bowel disease, and he experienced several episodes of severe infections (Table 1). Laboratory tests revealed severe neutropenia but a normal concentration of lactic acid, uric acid and triglycerides in serum (Table 1). Due to unsatisfactory response to G-CSF (2.7 μ g/kg/24 h), a treatment with EMPA was initiated (of label use).

P2: Male patient, currently 13 years old, was born from normal gestation and labour. A single hypoglycaemia episode occurred on the 8th day of life. During the diagnostic process of recurrent infections (4 \times acute otitis media, 2 \times upper airway infection, purulent inflammation of the axillary pit, and soft tissue infection in the eye region) performed at 9 months of age, lipid disorders, hypoglycaemia, hepatomegaly, and neutropenia were discovered. The patient was transferred to the Department of Metabolic Diseases in Warsaw. At 9 months of life, the patient demonstrated normal body weight (10 kg, 50th pc) and length (69 cm, 25th pc). Laboratory tests revealed hyperlactatemia (4.6 mmol/L, N < 2.22), hypertriglyceridemia (15.06 mmol/L, N < 1.71), hyperaminotransferasaemia (AST/ALT 108/149 IU/L, N < 40/30), neutropenia (115 cells/ μ l, N > 1000 cells/ μ l), and high normal uric acid (410 μ mol/L, N < 416) (Table 1). Abdominal ultrasound revealed a normal renal image but confirmed significant hepatomegaly with no abnormalities in the echo pattern. GSD 1b was suspected and confirmed at 9 months of age, with compound heterozygosity for the variants c.1042_1043 del CT and c.341A>G revealed in *SLC37A4* gene (Table 2).

Due to frequent infections (3 \times upper airway infections, 2 \times skin abscesses per year) and low neutrophil

count (900 cells/ μ l), G-CSF was introduced at a 2.5 μ g/kg/24 h when the patient was 2 years old. Despite normalisation of the neutrophil count, the patient went through numerous infections with three episodes of acute otitis media, four episodes of pneumonia and several surgeries for granulomatous otitis media and renal abscesses during 10 years of follow-up under treatment with G-CSF. Additionally, the patient developed inflammatory bowel disease requiring mesalazine at 9 years (initially 2 \times 500 mg, increased to 4 \times 500 mg due to unsatisfactory results).

We started an “off-label” EMPA treatment because of recurrent infections, low neutrophil count, and lack of inflammatory bowel disease remission on G-CSF (2.5 μ g/kg/24 h) and mesalazine (40 mg/kg/day).

During 1 year preceding the introduction of EMPA, the patient experienced submandibular lymphadenitis, three episodes of respiratory tract infection, and one episode of skin abscess. In addition, multiple stools per day (on average 7–8) and ulcer-like lesions in the mouth for 10 days per month were observed (Table 1). Laboratory tests performed before the introduction of EMPA showed normal lactic acid concentration in serum, but persistent neutropenia, high concentration of uric acid despite the use of allopurinol, and elevated levels of triglycerides (Table 1). Nutritional treatment did not affect hypertriglyceridemia and hyperuricemia. Fenofibrate and febuxostat were added before initiation of the EMPA therapy.

P3: Female patient, currently 9 years old, with uneventful gestational and neonatal history, experienced an episode of hypoglycaemia accompanying bilateral otitis media of *Streptococcus agalactiae* aetiology on 2nd day of life. Surgery on the 20th day of life was required to remove a skin abscess in the paranasal infraorbital region with subsequent generalised infection by *Staphylococcus aureus* (MSSA). At 5 months of age, an in-depth diagnostic procedure was initiated after an episode of generalised seizures accompanying low serum glucose (1.66 mmol/L). Hepatomegaly and neutropenia (190 cells/ μ l) (Table 1) suggested that the patient may suffer from GSD 1b. Mutation analysis of the *SLC37A4* gene revealed a homozygous variant (c. 1042_1043del) confirming the diagnosis (Table 2). At 15 months of age, recurrent infections, chronic neutropenia, and poor NADPH oxidase activity identified as abnormal “respiratory burst” (Table 2) prompted to use G-CSF at a dose of 5 μ g/kg/24 h. Gastrostomy was performed at age of 18 months due to feeding difficulties and was complicated by delayed wound healing. The frequency of infections decreased after the introduction of G-CSF. However, the patient developed colitis at 2.5 years of age. Despite mesalazine treatment initiated for persistent diarrhoea, pathologic lesions were found by colonoscopy (Table 2). The patient was repeatedly hospitalised, most frequently due to purulent lesions in the

TABLE 1 Clinical course and results of laboratory tests in patients with glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) without versus with empagliflozin (EMPA)

Patient/current age	P1/17 years	P2/13 years	P3/9 years	P4/17 months
Without/with EMPA	Without EMPA 1.5 years before EMPA	Without EMPA 1 year before EMPA	Without EMPA 1 year before EMPA	Without EMPA 6 months before EMPA
	- Final dose: 0.3 mg/kg/24 h - Treatment duration: 1.5 years	- Final dose: 0.4 mg/kg/24 h - Treatment duration: 1 year	- Final dose 0.4 mg/kg/24 h - Treatment duration: 1 year	- Final dose: 0.4 mg/kg/24 h - Treatment duration: 6 months
Number of urgent hospitalisations due to infection	9	1	6	4
Number of infections requiring antibiotic therapy	3	5	5	0
Mean number of stools/24 h	8–10	3–5	3–4	2–3
Average number of days per month with mucosal lesions	10–12	0 (from 1 year)	0 (from 6 months)	0
Neutrophil count (cell/ μ l) ^a	M: 131 R: 74–176	M: 470 R: 190–790	M: 1040 R: 550–1210	M: 815 R: 650–860
Mean G-CSF dose (μ g/kg/24 h)	2.7	0 (from 6 months)	0 (from 6 months)	0 (from 3 months)
Lactate (mmol/L, N < 2.22) ^a	M: 1.06 R: 1.03–1.09	M: 1.22 R: 1.14–1.30	M: 2.48 R: 1.93–3.28	M: 1.23 R: 1.04–1.4
Uric acid (μ mol/L, N < 416) ^a	M: 371.7 R: 303–475.8	M: 280.75 R: 243.87–327.14	M: 386.62 ^c R: 333.1–422.31	M: 237.92 R: 196.3–261.7
Triglycerides (mmol/L, N < 1.71) ^a	M: 0.71 R: 0.6–0.75	M: 0.68 R: 0.63–0.74	M: 4.69 ^d R: 3.37–14.31	M: 1.19 R: 1.0–1.31

Abbreviations: G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; M, median; N, normal; R, range.

^aResults of laboratory tests in patients without infection.

^bPatient additionally treated with allopurinol.

^cPatient additionally treated with febuxostat.

^dPatient additionally treated with fenofibrate.

TABLE 2 Patients with glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) summary

	P1	P2	P3	P4
Molecular analysis	c.1042_1043del, (p.Leu348Valfs*53) homozygous	c.[1042_1043del]; [341A>G], (p. [Leu348Valfs*53]; [Gln114Arg])	c.1042_1043del, (p.Leu348Valfs*53) homozygous	c.[1042_1043del]; [1175del], p.[Leu348Valfs*53]; [Ser392Ilefs*11]
Initial presentation	INF, HMG, HGL	HGL, INF, HMG, HTG, HLA	HGL, INF, HTG, HLA	INF, HLA, HTG
Age at diagnosis (months)	4	9	1	2.5
Gender	Male	Male	Female	Female
Age/dose when starting G-CSF treatment	2 years old 5 µg/kg/24 h	2 years old 2.5 µg/kg/24 h	15 months 5 µg/kg/24 h	8 months 4 µg/kg/24 h
Respiratory burst before/after starting G-CSF treatment	Reduced/reduced	Reduced/normal	Reduced/normal	Reduced/normal
Total follow-up period (years)	17	13	8	1
IBD, age (years) start of mesalazine treatment	3	9	2.5	-
Hypertension	No	Yes	No	No

Abbreviations: G-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; HGL, hypoglycemia; HLA, high lactic acid; HMG, hepatomegaly; HTG, hypertriglyceridemia; IBD, inflammatory bowel disease; INF, severe/recurrent infection.

gastrostomy area requiring surgical treatment. The gastrostomy tube could only be removed at the age of eight due to long-lasting feeding difficulties. Recurrent sinusitis, otitis, and poor control of inflammatory bowel disease despite treatment with G-CSF and mesalazine prompted introduction of an EMPA (off label use). The dose was gradually increased to a final dose of 0.4 mg/kg/24 h.

On daily administration of G-CSF (6 µg/kg/24 h) and mesalazine (2 × 500 mg), the parameters reflecting metabolic control (lactic acid, uric acid, and triglycerides concentration in serum) remained within normal limits. However, during the year preceding the introduction of EMPA, a gradual reduction of neutrophil count has been observed. The patient has been hospitalised six times for severe infections, and five times she required outpatient therapy with antibiotics (Table 1). Remission of inflammatory bowel disease has not been achieved (Table 1).

P4: Female patient, currently 17 months old, with uneventful neonatal history, developed a generalised infection of *MSSA* aetiology at 2 months of age. Laboratory results demonstrated a high triglyceride level (18–27.36 mmol/L) (Table 2). On admission to the Department of Metabolic Diseases in the Children's Memorial Health Institute at 2.5 months of age, the girl weighed 5 kg (3rd–10th c), and her length was 55 cm (50th c). Laboratory tests revealed hyperlactatemia (13.98 mmol/L, N < 2.22), hypertransaminasemia (ALT/AST 92/29 IU/L,



FIGURE 1 Postoperative wound healing before EMPA treatment (the gastrostomy area 26 days after surgery)

N < 30/40), and hypertriglyceridemia (20.62 mmol/L, N < 1.71). Hepatomegaly, without nephromegaly or abnormal echo pattern, was found in ultrasound examination (Table 2). Initially, no significant neutropenia was observed (780–890 cells/µl), but NADPH oxidase activity was reduced. GSD 1b was confirmed by identification of

biallelic mutations in *SLC37A4* gene (c.1042_1043del and c.1175del) (Table 2). We modified the diet and started prophylactic amoxicillin for neutropenia. At 6 months of age, the patient required hospitalisation due to generalised infection with *Enterococcus faecalis*. At 8 months of age, G-CSF was introduced at a dose of 4 µg/kg/24 h due to recurrent generalised infections and persisting neutropenia. The normalisation of neutrophil count and NADPH oxidase activity has been observed after introduced G-CSF (Table 2). Two months later, increasing difficulties in taking regular oral meals necessitated the emergence of a gastrostomy. The procedure was complicated by delayed wound healing. Once again, the neutrophil count and NADPH oxidase activity were checked and proved to be in normal range. Due to the exhaustion of all available methods of treatment (local and generalised antibiotic, disinfectants etc.) taking into consideration promising reports on the beneficial effects of EMPA on wound healing in patients with GSD 1b, on day 26 after the surgery, EMPA (off label use) was introduced (Figure 1).

5 | RESULTS

P1: For 1 year and 6 months, EMPA (0.3 mg/kg/24 h) was administered in combined treatment with G-CSF (2.7 µg/kg/24 h). Good general condition, improvement in blood differential, and lack of infections prompted reducing the G-CSF dose to 1.4 µg/kg/24 h and subsequently withdrawing it. Currently, the boy is off G-CSF for 6 months (Table 1). Following the introduction of EMPA, a significant reduction in the number of infectious episodes and the number of stools per day with the resolution of mouth sores or skin abscesses (Table 1). The patient experienced a single episode of pulmonary infection requiring antibiotic therapy in an outpatient setting after the introduction of EMPA (Table 1). Metabolic control and neutrophil counts remain within normal limits (Table 1). Despite the expected glucosuria, no hypoglycaemia or urinary tract infections were observed during treatment.

P2: We started filgrastim (2.5 µg/kg/24 h) and EMPA (0.4 mg/kg/24 h), and for 1 year, the patient received both. As a result, we observed a reduced frequency of infections, mean number of stools per day, and lower incidence of mouth sores. Significant clinical improvement and satisfactory neutrophil counts (above 1000 cells/µl) allowed gradual withdrawal of G-CSF (Table 1). Currently, the patient is off G-CSF for 6 months, with a single upper respiratory tract infection treated symptomatically. The number of stools was significantly reduced, and no mucosal lesions were observed (Table 1). Metabolic control, that is serum concentration of lactic acid, uric acid and triglycerides, improved, although these might be caused by simultaneous



FIGURE 2 Postoperative wound healing 3 days after introduction of EMPA treatment (the gastrostomy area 29 days after surgery)

introduction of fenofibrate and febuxostat. No adverse reactions to EMPA treatment were observed.

P3: Combined treatment with G-CSF (6 µg/kg/24 h) and EMPA (0.4 mg/kg/24 h) resulted in clinical improvement, that is reduced frequency of hospitalisations for infections down to three per year, the need for outpatient treatment down to two per year, with fewer stools per day and only a few mouth sores (Table 1). We recorded no urinary tract infections and a single episode of hypoglycaemia (1.44 mmol/L) related to the delayed supply of the night meal. Due to persistently low neutrophil count (median number 815 cells/µl [range: 650–860 cells/µl]), G-CSF after a year of combined treatment with EMPA was not withdrawn, but its dose was reduced by 50% (Table 1).

P4: The patient was treated with G-CSF (2 µg/kg/24 h) and EMPA (0.4 mg/kg/dl) for 2 months. Acceleration of wound healing was observed 3 days after introducing EMPA (Figure 2), while 2 days later, it was possible to discharge the patient home. Although EMPA was used for a brief period (6 months), an increase in the neutrophil count was observed (Table 1). Two months after the introduction of EMPA, it was possible to withdraw G-CSF (Table 1). No infections occurred, and no adverse reactions to treatment were observed.

6 | DISCUSSION

In the maturation process, neutrophils lose most of their mitochondria and become dependent on the energy

coming from anaerobic glycolysis. As a result, glucose 6-phosphate, the product of the first glycolysis stage, is also used in the pentose phosphate cycle. The pentose phosphate pathway serves, among others, in production of NADPH, which is used by NADPH oxidase to produce free oxygen radicals.²

1,5 AG is common in food, but its function in vivo is still unknown.^{2,3} Under physiologic conditions, 1,5 AG6P is transported to the ER, converted by glucose-6-phosphatase 3 (G6PC3) to 1,5 AG and phosphate, and eliminated from the cell.^{2,3} In patients with GSD 1b, the transporter deficiency causes 1,5 AG6P accumulation in the cytoplasm of neutrophils. Excess of 1,5 AG6P inhibits hexokinase and the conversion of glucose into glucose-6-phosphate and therefore insufficient cell energy production. This results in energy deficiency and impaired production of free oxygen species.^{2,3}

Treatment with G-CSF positively affects the neutrophil count, it reduces frequency and severity of infections observed in patients with GSD 1b. Unfortunately, pathological effects are not eliminated and life-threatening infections are still observed, while inflammatory bowel disease is often poorly controlled. Moreover, such treatment is not free of adverse reactions, with osteoarticular pain, gingival hypertrophy and bleeding, splenic enlargement often accompanied by hypersplenism, and an increased risk of hematologic neoplasms.^{4,6}

EMPA inhibits the reabsorption of glucose from primary urine, therefore leading to reduced glucose concentration in serum. The drug is successfully used in adult patients to control diabetes mellitus type 2, providing cardio- and nephroprotective effects due to reduced blood pressure.^{7,8} EMPA has also been reported to inhibit the reuptake of 1,5 AG in renal tubules.^{3,8} Lowering the serum concentration of 1,5 AG reduces the concentration of 1,5 AG6P in the neutrophil cytoplasm. This decrease leads to an unblocking of the glycolysis and the pentose phosphate cycle, thus extension in the survival and the improvement in function of neutrophils^{3,5}.

The most common adverse reactions of EMPA treatment include episodes of hypoglycaemia (when the drug is used with another hypoglycaemic agent) and an increased frequency of genitourinary infections.^{3,6-8} None of these has been observed in our patients. The number of neutrophils increased, and the frequency of infections was reduced.^{3,8}

Auspicious results of treating neutropenia with EMPA in patients with GSD 1b suggest a need to perform further studies. In addition, considering the reported nephro- and cardioprotective effect of the drug, a longer follow-up might show whether there are any other beneficial effects of EMPA treatment in patients with GSD 1b.

7 | CONCLUSIONS

The case reports presented above confirm the efficacy of EMPA in the short-term treatment of neutropenia in GSD1b patients, as described by Wortmann et al. and Grünert et al.^{3,5} EMPA treatment results in significant clinical improvement. Through the therapy, we observed: the reduced frequency of infections, the decrease in number of bowel movements and significant improvement in wound healing (Table 1). The EMPA therapy led to partial or a complete withdrawal of G-CSF in all patients. Clinical improvement seems to be related mainly to amelioration of neutrophil function. None of the patients revealed significant adverse reactions to EMPA treatment. In all four patients, the EMPA therapy is continued.

CONFLICT OF INTEREST

Magdalena Kaczor, Milena Greczan, Karolina Kierus, Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga, Elżbieta Ciara, Barbara Piątosza, Dariusz Rokicki, Janusz Książyk and Dorota Wesół-Kucharska declare that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Magdalena Kaczor: designed the study, collected data, data analyses, data interpretation and wrote the manuscript. Milena Greczan: designed the study, collected data, data analyses, data interpretation, contributed to the drafting of the manuscript. Karolina Kierus: designed the study, collected data, data analyses, data interpretation, contributed to the drafting of the manuscript. Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga: collected data, contributed to the drafting of the manuscript, critically reviewed the manuscript. Elżbieta Ciara: collected data, contributed to the drafting of the manuscript, critically reviewed the manuscript. Barbara Piątosza: collected data, data analyses, contributed to the drafting of the manuscript, critically reviewed the manuscript. Dariusz Rokicki: designed the study, data analyses, data interpretation, contributed to the drafting of the manuscript, critically reviewed the manuscript. Janusz Książyk: data analyses, contributed to the drafting of the manuscript, critically reviewed the manuscript. Dorota Wesół-Kucharska: corresponding author, designed the study, collected data, data analyses, data interpretation, wrote part of the manuscript, critically reviewed the manuscript.

INFORMED CONSENT

All procedures followed were in accordance with ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

ANIMAL RIGHTS

This article does not contain any studies with animal subjects performed by any of the authors.


DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data archiving is not mandated but data will be made available on reasonable request.

ORCID

Magdalena Kaczor  <https://orcid.org/0000-0003-1269-5084>

Milena Greczan  <https://orcid.org/0000-0003-4301-9927>

Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga  <https://orcid.org/0000-0002-3813-4480>

Elżbieta Ciara  <https://orcid.org/0000-0002-1065-7968>

Barbara Piątoś  <https://orcid.org/0000-0001-8949-047X>

Dariusz Rokicki  <https://orcid.org/0000-0002-6932-4586>

Janusz Książyk  <https://orcid.org/0000-0002-9136-2722>

Dorota Wesół-Kucharska  <https://orcid.org/0000-0003-0274-1278>

REFERENCES

1. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2014;16(11):e1-e29.
2. Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stephenne X, et al. Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. *PNAS*. 2019;116(4):1241-1250.
3. Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TGJ, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib with an SGLT2 inhibitor. *Blood*. 2020;136(9):1033-1043.
4. Dale DC, Bolyard AA, Marrero T, et al. Neutropenia in glycogen storage disease Ib: outcomes for patients treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 2019;26(1):16-21.
5. Grünert SC, Elling R, Maag B, et al. Improved inflammatory bowel disease, wound healing and normal oxidative burst under treatment with empagliflozin in glycogen storage disease type Ib. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15:218.
6. Visser G, de Jager W, Verhagen LP, et al. Survival, but not maturation, is affected in neutrophil progenitors from GSD-1b patients. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(2):287-300.
7. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(4):323-334.
8. Paterno E, Pawar A, Franklin JM, et al. Empagliflozin and the risk of heart failure hospitalisation in routine clinical care. *Circulation*. 2019;139(25):2822-2830.

How to cite this article: Kaczor M, Greczan M, Kierus K, et al. Sodium-glucose cotransporter type 2 channel inhibitor: Breakthrough in the treatment of neutropenia in patients with glycogen storage disease type 1b? *JIMD Reports*. 2022;63(3):199-206. doi:10.1002/jmd2.12278

Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin

Tracking no: ADV-2023-012403R1

Magdalena Kaczor (Children's Memorial Health Institute, Poland) Stanislaw Malicki (Jagiellonian University, Poland) Justyna Folkert (Jagiellonian University, Poland) Ewelina Dobosz (Jagiellonian University, Poland) Danuta Bryzek (Jagiellonian University, Poland) Barbara Chruścicka-Smaga (Jagiellonian University, Poland) Milena Greczan (Children's Memorial Health Institute, Poland) Dorota Wesół-Kucharska (Children's Memorial Health Institute, Poland) Barbara Piatosa (Children's Memorial Health Institute, Poland) Emilia Samborowska (Children's Memorial Health Institute, Poland) Joanna Madzio (Medical University of Lodz, Poland) Janusz Książyk (Children's Memorial Health Institute, Poland) Ewa Ehmke vel Emczyńska (Children's Memorial Health Institute, Poland) Małgorzata Hajdacka (Children's Memorial Health Institute, Poland) Jan Potempa (Dental School, University of Louisville, United States) Wojciech Młynarski (Medical University of Lodz, Poland) Dariusz Rokicki (Children's Memorial Health Institute, Poland) Florian Veillard (Jagiellonian University, Poland)

Abstract:

Neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b (GSD1b) are caused by the accumulation of 1,5-anhydroglucitol-6-phosphate (1,5-AG6P) in granulocytes. The antidiabetic drug empagliflozin reduces the concentration of 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG), thus restoring neutrophil counts and functions, leading to promising results in previous case reports. Here, we present a comprehensive analysis of neutrophil function in seven GSD1b patients and 11 healthy donors, aiming to evaluate the immediate (after 3 months) and long-term (after 12 months) efficacy of empagliflozin compared to the reference treatment with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). We found that most patients receiving G-CSF remained neutropenic with dysfunctional granulocytes, whereas treatment with empagliflozin increased neutrophil counts and improved functionality by inhibiting apoptosis, restoring phagocytosis and the chemotactic response, normalizing the oxidative burst, and stabilizing cellular and plasma levels of defensins and lactotransferrin. These improvements correlated with the decrease in serum 1,5-AG levels. However, neither G-CSF nor empagliflozin overcame deficiencies in the production of cathelicidin/LL-37 and neutrophil extracellular traps. Given the general improvement promoted by empagliflozin treatment, patients were less susceptible to severe infections. G-CSF injections were therefore discontinued in six patients (and the dose was reduced in the seventh) without adverse effects. Our systematic analysis, the most extensive reported thus far, has demonstrated the superior efficacy of empagliflozin compared to G-CSF, restoring the neutrophil population and normal immune functions. EudraCT 2021-000580-78

Conflict of interest: No COI declared

COI notes:

Preprint server: No;

Author contributions and disclosures: All authors reviewed and approved the article and participated in the discussion and interpretation of data. Dariusz Rokicki, Florian Veillard, Wojciech Młynarski, Jan Potempa, and Magdalena Kaczor conceptualized and designed the study. Magdalena Kaczor, Milena Greczan, Dorota Wesół-Kucharska, Janusz Książyk and Dariusz Rokicki provided direct patient care and collect patient data and Wojciech Młynarski provided access to control donors. Magdalena Kaczor, Stanislaw Malicki, Justyna Folkert, Ewelina Dobosz, Danuta Bryzek, Barbara Chruścicka-Smaga, Barbara Piatosa, Emilia Samborowsk, Joanna Madzio, Ewa Ehmke vel Emczyńska, Małgorzata Hajdacka carried out experiments, data analysis and figures preparation. Florian Veillard and Magdalena Kaczor wrote the manuscript with critical evaluations and revisions from Dariusz Rokicki, Wojciech Młynarski, Jan Potempa and Janusz Książyk.

Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: The data that support the findings of this study are available upon reasonable request to the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Clinical trial registration information (if any): EudraCT 2021-000580-78

Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin

Magdalena Kaczor^{1*}, Stanislaw Malicki^{2*}, Justyna Folkert², Ewelina Dobosz², Danuta Bryzek², Barbara Chruscicka-Smaga², Milena Greczan¹, Dorota Wesół- Kucharska¹, Barbara Piątosza³, Emilia Samborowska⁴, Joanna Madzio⁵, Janusz Książczyk¹, Ewa Ehmke vel Emczyńska¹, Małgorzata Hajdacka¹, Jan Potempa^{2,6}, Wojciech Młynarski⁵, Dariusz Rokicki¹, Florian Veillard²

*Equally co-author.

- 1) Department of Pediatrics, Nutrition and Metabolic Diseases, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland
- 2) Department of Microbiology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnologies, Jagiellonian University, Krakow, Poland
- 3) Histocompatibility Laboratory, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland
- 4) Inborn Errors of Metabolism Laboratory, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland
- 5) Department of Pediatrics, Oncology & Hematology, Medical University of Łódź, Łódź, Poland
- 6) Department of Oral Immunology and Infectious Diseases, University of Louisville School of Dentistry, KY, USA

Corresponding Author

Florian Veillard

Jagiellonian University

Krakow, Poland

florian.veillard@uj.edu.pl

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request to the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Abstract

Neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b (GSD1b) are caused by the accumulation of 1,5-anhydroglucitol-6-phosphate (1,5-AG6P) in granulocytes. The antidiabetic drug empagliflozin reduces the concentration of 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), thus restoring neutrophil counts and functions, leading to promising results in previous case reports. Here, we present a comprehensive analysis of neutrophil function in seven GSD1b patients and 11 healthy donors, aiming to evaluate the immediate (after 3 months) and long-term (after 12 months) efficacy of empagliflozin compared to the reference treatment with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). We found that most patients receiving G-CSF remained neutropenic with dysfunctional granulocytes, whereas treatment with empagliflozin increased neutrophil counts and improved functionality by inhibiting apoptosis, restoring phagocytosis and the chemotactic response, normalizing the oxidative burst, and stabilizing cellular and plasma levels of defensins and lactotransferrin. These improvements correlated with the decrease in serum 1,5-AG levels. However, neither G-CSF nor empagliflozin overcame deficiencies in the production of cathelicidin/LL-37 and neutrophil extracellular traps. Given the general improvement promoted by empagliflozin treatment, patients were less susceptible to severe infections. G-CSF injections were therefore discontinued in six patients (and the dose was reduced in the seventh) without adverse effects. Our systematic analysis, the most extensive reported thus far, has demonstrated the superior efficacy of empagliflozin compared to G-CSF, restoring the neutrophil population and normal immune functions. EudraCT 2021-000580-78

Key words: glycogen storage disease type 1b, neutropenia, *SLC37A4*, SGLT2 inhibitor, empagliflozin

Key points:

- Empagliflozin decreases the susceptibility to infection in Glycogen storage disease type 1b
- Empagliflozin significantly improves neutrophil population and functions in GSD1b, surpassing G-CSF limited efficacy

Introduction

Glycogen storage disease type 1b (GSD1b, OMIM: #232220) is a rare metabolic defect with a prevalence of 1:500,000 that predominantly affects carbohydrate metabolism¹. It is caused by biallelic mutations in the *SLC37A4* gene, resulting in a deficient glucose-6-phosphate transporter (translocase G6P) in the endoplasmic reticulum (ER) membrane². The final step in gluconeogenesis is G6P hydrolysis to glucose, which only takes place in the ER³. Translocase G6P deficiency therefore leads to episodes of hypoglycemia and elevated levels of G6P in the cytoplasm⁴. The accumulation of G6P triggers abnormal metabolic processes that typify GSD1b, including hyperlactatemia, hypertriglyceridemia, hyperuricemia and hypercholesterolemia^{4,5}. Furthermore, the storage of excess glycogen and fats causes the enlargement and dysfunction of the liver and kidneys.

The primary treatment for severe hypoglycemia accompanied by metabolic disruption is the frequent consumption of protein-rich meals with minimal levels of simple sugars, including feeding infants at 2-h intervals day and night⁴. However, GSD1b also causes neutrophil deficiency and dysfunction, which has a severe impact on quality of life from the neonatal period onward by making patients susceptible to frequent, life-threatening infection^{4,6}. Later in life, neutropenia causes other comorbidities such as inflammatory bowel disease (IBD) and recurrent aphthous stomatitis. Until recently, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) was the only approved treatment for congenital neutropenia^{4,7}. However, although G-CSF can restore the neutrophil count, its ability to address neutrophil dysfunction is more limited and treatment may increase long-term susceptibility to acute myeloid leukemia, myelodysplasia and other forms of cancer⁸⁻¹¹.

The accumulation of 1,5 anhydroglucitol-6-phosphate (1,5-AG6P) in granulocytes was recently identified as the cause of neutropenia in GSD1b². This compound is formed when 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), a glucose analog found in the diet, is phosphorylated by hexokinases. Normally, 1,5-AG6P is transported from the cytosol of neutrophils to the ER, where it is dephosphorylated by glucose-6-phosphatase (G6PC3) and then eliminated. But a deficiency for translocase G6P causes 1,5-AG6P to accumulate in the cytosol, where it inhibits glucose phosphorylation by hexokinases, thereby preventing glycolysis, the primary energy source for mature neutrophils in the absence of mitochondria^{3,12}. These deficiencies impair the bactericidal activity of neutrophils, and cause them to undergo premature apoptosis¹³⁻¹⁵.

The discovery of the underlying cause of this congenital form of neutropenia has facilitated the pursuit of more targeted treatment options. Inhibitors of renal sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2), such as empagliflozin, appear to be the most promising options^{3,8}. Empagliflozin is used to prevent the reabsorption of glucose and its derivatives in the proximal tubule of the nephron in diabetes patients^{16,17}. In GSD1b, empagliflozin also inhibits the feedback of 1,5-AG and reduces 1,5-AG6P levels in the blood and granulocytes⁸. Empagliflozin has been shown to increase the population of viable and functional neutrophils in a limited number of patients^{3,8}. Furthermore, retrospective analysis have shown that empagliflozin have positive effects on neutrophil dysfunction-related symptoms including inflammatory bowel disease, oral and urogenital mucosal lesions, infections or skin abscesses¹⁸⁻²⁰. Here, we present the first prospective clinical trial evaluating the effectiveness of SGLT2 inhibition in GSD1b with the most extensive and comprehensive analysis of neutrophil dysfunction in patients thus far, in order to investigate both the immediate and long-term efficacy of empagliflozin. We evaluated the effect of empagliflozin on neutrophil apoptosis, phagocytosis, chemotaxis, the oxidative burst, cellular and plasma levels of antimicrobial peptides (AMPs) and LL-37, and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) compared to the control treatment with G-CSF.

Materials and methods

EMPAtia clinical trial

The EMPAtia clinical trial “Evaluation of the effectiveness and safety of empagliflozin in treating neutropenia in patients with GSD1b” (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2021-000580-78/PL>) has been running in Poland since March 2022. This trial, funded by the Medical Research Agency (ABM), was designed by researchers from the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw and has enrolled 92% of identified pediatric patients with GSD1b in Poland (12 patients in total). Informed written consent to participate in the EMPAtia clinical trial was obtained from the patients and/or their parents. In collaboration with the FixNet project (Fix Neutropenia: Focusing on neutrophil proteases defect which serve as novel diagnostic and therapeutic options), seven of these patients (58%) qualified for the additional assessment of neutrophil functions according to the EMPAtia/FixNet substudy protocol (Suppl. Figure S1). Given the use of empagliflozin for an average of 1 year, four patients were not included because neutrophils could not be collected at baseline before the initiation of treatment, and one additional patient was excluded because the parents did not provide consent. The EMPAtia substudy was reviewed and approved by the bioethics commission at the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw (16/KBE/2021). It was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments. No personal or identifiable data relating to the substudy are included in this article. Healthy controls were originally enrolled in the FixNet project from the Foundation for Polish Science with informed written consent (approved by the Human Research Ethics Committee, Medical University of Łódź – RNN/211/22/KE and RNN/353/19/KE).

Before the trial started, all seven patients were treated daily with G-CSF. This was initially maintained when daily treatment with empagliflozin commenced (5 mg at weights below 20 kg, 10 mg at weights of 20–39 kg, and 20 mg at weights above 39 kg). The administration of G-CSF was stopped when the neutrophil count exceeded 1×10^3 cells/L at follow-up visits scheduled in the protocol (every 3 months on average). However, G-CSF treatment was reinstated if neutrophil numbers dipped below this threshold. Inclusion and exclusion criteria, as well as the protocol used to address the potential side effects of empagliflozin, are provided in the supplementary materials and methods. Neutrophils were isolated from the peripheral blood of patients and healthy donors as previously described²¹. The complete protocol is provided in the supplementary materials. Blood was collected

before the trial as well as 3 and 12 months after the initiation of empagliflozin treatment. Complete blood counts were determined at the same times.

Apoptosis assay

Freshly-isolated neutrophils were labeled with annexin V (BD Pharmingen) and apoptotic cells were detected by flow cytometry using a BD FACSLyric system.

Migration and chemotactic response assay

Neutrophil migration and chemotaxis in response to 10% human serum (Sigma-Aldrich) were determined using a Boyden's chamber model and the fluorogenic CytoSelect 96-well cell migration assay with 3- μ m ports (Cell Biolabs) according to the manufacturer's instructions.

Induction and quantification of NETs

Freshly isolated neutrophils were stimulated with 25 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) and extracellular DNA was recovered after 3 h and digested with micrococcal nuclease (Thermo Fisher Scientific). The quantity of DNA was determined using SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Thermo Fisher Scientific) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm. NETs were also identified by confocal microscopy as previously described²¹. Cells were stained with a rabbit anti-human neutrophil elastase antibody (#01-14-051200, Athens Research and Technology) diluted at 1:500 in phosphate-buffered saline (PBS) containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% saponin for 1 h, followed by APC-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab')₂ (#111-136-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted at 1:1000 for 45 min. Nuclei were counterstained with 1 μ g/mL Hoechst 33342 (Invitrogen).

NADPH oxidase assay

The ability of neutrophils to generate reactive oxygen species via NADPH oxidase was determined using a dihydrorhodamine 123 (DHR) assay followed by flow cytometry as previously described²².

Plasma concentration of 1,5-AG ([plasma 1,5-AG])

50 μ L of serum were spiked with 10 μ L of the internal standard (100 μ g/mL 1,5-AG-¹³C₆) and 150 μ L of acetonitrile to precipitate proteins. Samples were vortexed for 2 min and centrifuged before [plasma 1,5-AG] was measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Waters ACQUITY UPLC glycan BEH amide column (2.1 \times 150 mm, 1.7 μ m particle size) with isocratic elution and a total runtime of 10 min.

The mobile phase consisted of solvent A (water with 0.1% (v/v) ammonium hydroxide) and solvent B (acetonitrile with 0.1% (v/v) ammonium hydroxide). Eluted fractions were injected into the mass spectrometer followed by negative electrospray ionization (ESI) and analysis by multiple-reaction monitoring (MRM) with the quantification range 1–100 µg/mL.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The following commercially available ELISA assay kits were used to quantify various AMPs in cell lysates and plasma samples according to the manufacturers' instructions: Human G-CSF Instant ELISA kit (Invitrogen, BMS2001NST), EnzCheck Myeloperoxidase (MPO) Activity Assay kit (Invitrogen, E33856), Human LTF/LF (lactoferrin) ELISA kit (Elabscience, E-EL-H5200), Human CAMP/Cathelicidin antimicrobial ELISA kit (EIAab, E1046h) and Human HNP1-3 (neutrophil peptide 1-3) ELISA kit (Elabscience, E-EL-H2299).

Statistical analysis

Data were analyzed and visualized using Graphpad Prism (Graphpad Software). Statistical differences between patients and controls were determined by ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) for unpaired data. Statistical differences between datasets collected before and during empagliflozin treatment (0, 3 and 12 months) were determined by mixed-effect analysis. Two-tailed nonparametric Spearman correlation assay was used to determine potential correlations with [plasma 1,5-AG] or [plasma G-CSF]. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

The EMPATia study was approved by bioethics commission at the Children's Memorial Health Institute in Warsaw no 16/KBE/2021 and FixNet project was approved by the Human Research Ethics Committee, Medical University of Łódź (RNN/211/22/KE and RNN/353/19/KE).

Results

Clinical course during empagliflozin treatment

Seven pediatric patients (three girls and four boys, median age 11 years, age range 3–19 years) with various biallelic mutations in the *SLC37A4* gene were enrolled for neutrophil functional tests (Tables I and II and Figure 1). Before empagliflozin treatment commenced, all seven were treated with G-CSF (median dose 2 µg/kg/day, dose range 1–6.5 µg/kg/day). The median dose of empagliflozin as the trial began was 0.42 mg/kg/day (range 0.3–0.47 mg/kg/day).

During G-CSF treatment, in the year before the start of the trial, the median number of infections requiring antibiotics was three (Q1 = 1.5; Q3 = 5) (Tables 1 and 2). The year following the start of empagliflozin treatment, the median number of infections decreased to one (Q1 = 0.5; Q3 = 2.5) and only *patient 4* experienced an increase in the number of infections, from 0 to 1 the following year (Table 1). One patient was diagnosed with IBD before the study. During the first year of empagliflozin treatment, IBD symptoms did not become any more severe in this patient and were not observed in the other six. There was also no significant increase in the frequency of hypoglycemic episodes or side effects during the first year of empagliflozin treatment in any of the patients.

Measurement of [plasma 1,5-AG]

Before empagliflozin treatment, the median concentration of 1,5-AG in the plasma of the seven patients was 47.2 µg/mL (Q1 = 43.35 µg/mL; Q3 = 52.95 µg/mL) (Table 2 and Figure 1A). This decreased significantly ($P < 0.0001$) to 6.2 µg/mL (Q1 = 2.85 µg/mL; Q3 = 11.2 µg/mL) after 3 months and to 5.3 µg/mL (Q1 = 4.6 µg/mL; Q3 = 9.45 µg/mL) after 12 months (Table 2 and Figure 1A). Substantially lower 1,5-AG levels were observed in all seven patients (Figure 1B).

Leukocyte and neutrophil counts

Under G-CSF treatment, the median neutrophil count in the seven patients was 0.86×10^3 cells/µL (Table 2 and Figure 1C). This was significantly lower than the median count of 3.1×10^3 cells/µL in the 11 control donors ($P = 0.001$). During empagliflozin treatment, the median neutrophil count of the seven patients increased to 1.95×10^3 cells/µL after 3 months and 2.24×10^3 cells/µL after 12 months (Table 2 and Figure 1C). Only *patient 2* showed a significant decline in the neutrophil count between 3 and 12 months of empagliflozin

treatment (Figure 1D). G-CSF was therefore discontinued in six of the seven patients, and the dosage was reduced in *patient 2* (Table 1). Spearman analysis revealed a correlation between the neutrophil count and [plasma 1,5-AG] in the patients ($P = 0.018$) (Figure 1E). G-CSF was therefore discontinued in five of the seven patients during the first 3 months, and only one patient still required G-CSF after 1 year, at a reduced dosage (Table 1). This increase in neutrophil count also affected the leukocyte count, which similarly increased after empagliflozin treatment (Table 2 and Figure 1F-H). However, there was no significant effect on the lymphocyte or monocyte populations (Table 2 and Figure 1I-N).

Neutrophil viability

The proportion of viable neutrophils (negative for annexin V) varied widely among the seven patients during G-CSF treatment, with a median of 34.8% (Q1 = 30.9%; Q3 = 76.3%) (Table 2 and Figure 2A). After 3 and 12 months on empagliflozin, the proportion increased to 61.7% (Q1 = 44.9%; Q3 = 71.3%) and 67.8% (Q1 = 57.1%; Q3 = 74.6%), respectively (Table 2 and Figure 2A). However, the effect varied greatly, improving cell viability in patients with the lowest initial viability under G-CSF treatment but achieving limited or zero improvement in patients with a higher initial proportion of viable neutrophils (Figure 2B). Accordingly, there was no clear correlation between cell viability and [plasma 1,5-AG] ($P = 0.1979$) (Figure 2C). Given the inverse relationship between the proportions of viable and apoptotic cells, empagliflozin reduced the frequency of apoptosis in neutrophils when it was high under G-CSF treatment (Table 2 and Figure 2D-F).

Neutrophil mobility and chemotactic response

The mobility and chemotactic response of freshly isolated neutrophils were examined using a Boyden's chamber model. In the absence of a chemoattractant, the mobility of neutrophils from patients receiving G-CSG was deficient compared to neutrophils from healthy donors (median of 192 vs 1010 migrating cells, $P < 0.001$) (Table 2 and Figure 2G). After 12 months of empagliflozin treatment, median neutrophil mobility had increased in the seven patients but still lagged behind the healthy donors. Furthermore, neutrophil mobility decreased in some patients treated with empagliflozin and we observed no clear correlation between neutrophil mobility and [plasma 1,5-AG] (Figure 2H,I). The chemotactic response of neutrophils to human serum was deficient in patients receiving G-CSG compared to neutrophils from healthy donors (1421 vs 2487 migrating cells, $P = 0.345$) (Table 2 and Figure 2J). Following empagliflozin treatment, the median neutrophil chemotactic response

in the seven patients was restored to the level seen in healthy donors (Figure 2J). Chemotaxis increased in all patients, and was inversely correlated with [plasma 1,5-AG] ($P = 0.0457$) (Figure 2K,L).

Oxidative burst

We also analyzed the PMA-induced oxidative burst in neutrophils using a DHR test. Only *patient 2* showed a defective oxidative system, with a low proportion of positive neutrophils under G-CSF treatment (Figure 3A,B). This deficiency was corrected by empagliflozin, and no differences were observed in the other patients when G-CSF treatment was discontinued (Figure 3B). Therefore, there was no significant correlation between the DHR index and [plasma 1,5-AG] ($P = 0.1905$) (Figure 3C). There was also no significant difference in signal intensity between G-CSF and empagliflozin treatment (Figure 3D–F). The median intracellular concentration of MPO in neutrophils from patients treated with G-CSF and empagliflozin treatment was similar to that of healthy donors (Table 2 and Figure 3H). Individual variations were observed, but there was no overall increase in MPO levels in patients treated with empagliflozin (Figure 3I). Similarly, there was no correlation between [intracellular MPO] and [plasma 1,5-AG] (Figure 3J).

Phagocytosis

Neutrophil-mediated phagocytosis was assessed using fluorescent and pH-sensitive particles of *Staphylococcus aureus*. The median phagocytic activity of neutrophils from patients treated with G-CSF was significantly lower compared to that of healthy donors (1546 vs 3735 fluorescence units; $P < 0.0001$) (Table 2 and Figure 4A). However, after 12 months of empagliflozin treatment, the median phagocytic activity increased significantly ($P = 0.028$). All individual patients showed an increase in phagocytosis (Figure 4B) and there was a negative correlation between phagocytic activity and [plasma 1,5-AG] ($P = 0.0328$).

NETosis

Patients treated with G-CSF were deficient for NETosis following stimulation with PMA compared to healthy donors ($P < 0.0001$) (Table 2 and Figure 4D). Treatment with empagliflozin caused a significant increase in NETosis ($P < 0.05$), however not to the level observed in healthy donor neutrophils (Figure 4D). This slight increase was apparent in all seven patients (Figure 4E) and we observed a negative correlation between the induction of NETosis and [plasma 1,5-AG] ($P = 0.0007$) (Figure 4F). Furthermore, confocal microscopy demonstrated that neutrophils from patients, with G-CSF or empagliflozin, failed to produce

visible NETs structures following PMA stimulation, in contrast to neutrophils from the control donor (Figure 4G).

Production of AMPs

Cellular and secreted AMPs such as lactoferrin (LTF), defensins and LL-37 play a significant role in the antibacterial response of neutrophils. Median intracellular LTF concentrations were similar in patients treated with G-CSF or empagliflozin and in healthy donors and there was no consistent LTF profile at the individual level once empagliflozin treatment had commenced (Table 2 and Figure 5A–C). However, the median concentrations of intracellular defensins, plasma LTF and plasma defensins were significantly higher in patients treated with G-CSF compared to healthy controls (Table 2 and Figure 5E,I,M). Empagliflozin treatment resulted in a significant decrease in the concentration of these AMPs in all patients (Figure 5E,J,N). It is unclear whether the concentrations of these AMPs were higher in patients than healthy controls due to the disease or the high concentration of plasma G-CSF (Figure S2). The median levels of intracellular defensins, plasma LTF and plasma defensins were negatively correlated with [plasma 1,5-AG] and positively correlated with [plasma G-CSF] in all seven patients (Table 2 and Figure 5). The median [plasma CAMP/LL-37] in all seven patients was significantly lower ($P < 0.0001$) during treatment with G-CSF or empagliflozin compared to healthy donors (Table 2 and Figure 5Q). At the individual level, [plasma CAMP/LL-37] decreased in all patients following the start of empagliflozin treatment, but there was no correlation between [plasma CAMP/LL-37] and [plasma 1,5-AG], or between [plasma CAMP/LL-37] and [plasma G-CSF] (Figure 5R–T).

Discussion

The accumulation of 1,5-AG6P within the neutrophil cytosol has recently been identified as the cause of neutropenia in GSD1b. Lowering the plasma concentration of 1,5-AG using antidiabetic SGLT2 inhibitors such as empagliflozin has shown promising results^{2,3}. Several case reports have indicated that empagliflozin normalizes the neutrophil count and partially restores neutrophil function in some patients^{8,23–28}. In this setting, the EMPAtia clinical trial was initiated to evaluate the efficacy and safety of empagliflozin for the treatment of neutropenia in GSD1b patients on a larger scale. Twelve children, representing 92% of identified pediatric GSD1b patients in Poland, have been enrolled thus far. Seven were qualified for the additional assessment of neutrophil function under G-CSF treatment as well as 3 and 12 months after the initiation of empagliflozin therapy. We observed no side effects such as changes in the frequency of hypoglycemic episodes. Moreover, one patient already diagnosed with IBD did not experience any deterioration of the condition.

The ability of G-CSF to restore the immune functions of neutrophils in GSD1b patients has not been addressed adequately because there is only a small pool of patients and many of them do not produce enough neutrophils for testing⁹. During G-CSF treatment, before the administration of empagliflozin, six of the seven patients remained neutropenic with a neutrophil count below 1×10^3 cells/ μ L (Table 2 and Figure 2). The neutrophils from these patients showed various deficiencies despite the G-CSF treatment, including an inconsistent rate of apoptosis, lower mobility, a weaker chemotactic response, ineffective phagocytic activity, and impaired production of NETs following stimulation. As a result, these patients experienced frequent serious infections during the year preceding the start of the trial (median of three infections per year). However, with the exception of one patient, there was no serious deficiency in the oxidative burst, which suggests that G-CSF can at least restore this function. This last observation agrees with a previous report showing that most GSD1b patients treated with G-CSF have a normal oxidative system⁸

The dose of empagliflozin for pediatric GSD1b patients was based on the recommendations for adults with diabetes. We used a dose of 0.43 mg/kg/day, which is lower than that used in previous studies (0.7 mg/mL)⁸. Even so, this lower dose was sufficient to reduce the median [plasma 1,5-AG] in the patients from 47.2 to 6 μ g/mL (Figure 1). We also observed higher neutrophil counts in six of the seven patients, with median values of 1.95×10^3 cells/ μ L after 3 months and 2.24×10^3 cells/ μ L after 12 months of empagliflozin treatment. The neutrophil count declined in one patient between months 3 and 12 despite an

initial rise at the beginning of the trial. G-CSF treatment was therefore discontinued in the six patients with higher neutrophil counts and reduced in the other one. Empagliflozin did not significantly affect the monocyte or lymphocyte populations in any of the patients.

Empagliflozin reduced the inconsistent viability of neutrophils in the seven patients, indicating its ability to inhibit apoptosis compared to the limited efficacy of G-CSF. However, it did not fully restore the viability observed in healthy donors. Empagliflozin had only a mild impact on neutrophil mobility, but it increased the chemotactic response to human serum in all patients. This is likely to facilitate the recruitment of neutrophils to infection sites. Similarly, empagliflozin partially restored the phagocytic activity of neutrophils, which is necessary to eliminate pathogens. Despite an overall increase in NETosis following the administration of empagliflozin, the response still lagged behind that observed in healthy donors. Furthermore, we observed inverse correlations between [plasma 1,5-AG] and the neutrophil count, chemotactic response, phagocytosis, and NETosis. This highlights the central role of 1,5-AG and its derivative 1,5-AG6P in GSD1b patients, and confirms the mode of action of empagliflozin. Neutrophils from all patients treated with empagliflozin retained their normal oxidative burst following stimulation, as observed in previous studies. The lower number of infections probably reflects the enhancement of neutrophil antimicrobial defense mechanisms, improving the quality of life for patients by reducing the number and duration of hospital stays, and allowing the treatment of infections in an outpatient setting.

To the best of our knowledge, the production of AMPs by neutrophils in GSD1b patients has not been studied before. During treatment with G-CSF, the concentration of intracellular and plasma defensins and plasma LTF increased in all seven patients, which may reflect the dysfunctional neutrophils or the administration of G-CSF. Empagliflozin treatment reduced the levels of these AMPs, but the absence of untreated patients in the trial made it impossible to determine whether these AMP concentrations correlated with [plasma 1,5-AG] or [plasma G-CSF]. Interestingly, neither G-CSF nor empagliflozin were able to restore the production of CAMP/LL-37 and effective NETosis, despite the inverse correlation between NETosis and [plasma 1,5AG]. Accordingly, additional pathways that do not involve 1,5-AG or 1,5-AG6P must also be deficient in GSD1b patients.

This study included the most extensive and comprehensive examination of neutrophil functions in GSD1b patients reported thus far, and demonstrated the inability of G-CSF to reverse neutropenia and restore normal neutrophil antimicrobial functions. In contrast, our

analysis of the immediate and long-term effects of empagliflozin confirms the efficacy and safety of this antidiabetic drug for the treatment of GSD1b.

Acknowledgment

The Foundation for Polish Science (FNP) TEAM NET Programme, POIR.04.04.00–00–1603/18. Project title: Fix Neutropenia (FIXNET): focusing on neutrophil proteases defects which serve as novel diagnostic and therapeutic options and the EMPAtia project financed by the Medical Research Agency (MRA) grant No 2020/ABM/01/00047-00. The research by FV, JP, BCS, DB, ED, JF and SM has also been supported by a grant from the Priority Research Area BioS under the Strategic Programme Excellence Initiative at the Jagiellonian University.

Author contributions

All authors reviewed and approved the article and participated in the discussion and interpretation of data. Dariusz Rokicki, Florian Veillard, Wojciech Młynarski, Jan Potempa, and Magdalena Kaczor conceptualized and designed the study. Magdalena Kaczor, Milena Greczan, Dorota Wesół-Kucharska, Janusz Książyk and Dariusz Rokicki provided direct patient care and collect patient data and Wojciech Młynarski provided access to control donors. Magdalena Kaczor, Stanisław Malicki, Justyna Folkert, Ewelina Dobosz, Danuta Bryzek, Barbara Chruscicka-Smaga, Barbara Piątosa, Emilia Samborowski, Joanna Madzio, Ewa Ehmke vel Emczyńska, Małgorzata Hajdacka carried out experiments, data analysis and figures preparation. Florian Veillard and Magdalena Kaczor wrote the manuscript with critical evaluations and revisions from Dariusz Rokicki, Wojciech Młynarski, Jan Potempa and Janusz Książyk.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Bibliography

1. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;38(3):511–519.

2. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, et al. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose- 6-phosphate translocase is mutated in glycogen-storage disease types Ib and Ic. *Am. J. Hum. Genet.* 1998;63(4):976–983.
3. Maiorana A, Tagliaferri F, Dionisi-Vici C. Current understanding on pathogenesis and effective treatment of glycogen storage disease type Ib with empagliflozin: new insights coming from diabetes for its potential implications in other metabolic disorders. *Front. Endocrinol.* 2023;14:1145111.
4. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2014;16(11):e1.
5. Sentner CP, Hoogeveen IJ, Weinstein DA, et al. Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2016;39(5):697–704.
6. Visser G, Rake JP, Fernandes J, 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;137(2):187–191.
7. Visser G, Rake JP, Labrune P, et al. Consensus guidelines for management of glycogen storage disease type 1b - European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur. J. Pediatr.* 2002;161 Suppl 1:S120-123.
8. Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TGJ, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib with an SGLT2 inhibitor. *Blood.* 2020;136(9):1033–1043.
9. Roe TF, Coates TD, Thomas DW, Miller JH, Gilsanz V. Brief report: treatment of chronic inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib with colony-stimulating factors. *N. Engl. J. Med.* 1992;326(25):1666–1669.
10. Dale DC, Bolyard AA, Marrero T, et al. Neutropenia in glycogen storage disease Ib: outcomes for patients treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr. Opin. Hematol.* 2019;26(1):16–21.
11. Li AM, Thyagu S, Maze D, et al. Prolonged granulocyte colony stimulating factor use in glycogen storage disease type 1b associated with acute myeloid leukemia and with shortened telomere length. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 2018;35(1):45–51.
12. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 1982;70(3):550–557.
13. Kuijpers TW, Maianski NA, Tool ATJ, et al. Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). *Blood.* 2003;101(12):5021–5024.
14. Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood.* 2014;123(18):2843–2853.
15. Ambruso DR, McCabe ER, Anderson D, et al. Infectious and bleeding complications in patients with glycogenosis Ib. *Am. J. Dis. Child.* 1960. 1985;139(7):691–697.
16. DeFronzo RA, Hompesch M, Kasichayanula S, et al. Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36(10):3169–3176.
17. Al-Jobori H, Daniele G, Cersosimo E, et al. Empagliflozin and Kinetics of Renal Glucose Transport in Healthy Individuals and Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2017;66(7):1999–2006.
18. Grünert SC, Derks TGJ, Adrian K, et al. Efficacy and safety of empagliflozin in glycogen storage disease type Ib: Data from an international questionnaire. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2022;24(8):1781–1788.

19. Collen LV, Newburger PE, Snapper SB. Clinical Remission of Severe Crohn's Disease with Empagliflozin Monotherapy in a Pediatric Patient with Glycogen Storage Disease Type 1b. *JPGN Rep.* 2023;4(4):e356.
20. Calia M, Arosio AML, Crescitelli V, et al. Crohn-like disease long remission in a pediatric patient with glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin: a case report. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2023;16:17562848231202138.
21. Bryzek D, Ciaston I, Dobosz E, et al. Triggering NETosis via protease-activated receptor (PAR)-2 signaling as a mechanism of hijacking neutrophils function for pathogen benefits. *PLoS Pathog.* 2019;15(5):e1007773.
22. O'Gorman MR, Corrochano V. Rapid whole-blood flow cytometry assay for diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995;2(2):227–232.
23. Makrilakis K, Barmpagianni A, Veiga-da-Cunha M. Repurposing of Empagliflozin as a Possible Treatment for Neutropenia and Inflammatory Bowel Disease in Glycogen Storage Disease Type 1b: A Case Report. *Cureus.* 2022;14(7):e27264.
24. Grünert SC, Elling R, Maag B, et al. Improved inflammatory bowel disease, wound healing and normal oxidative burst under treatment with empagliflozin in glycogen storage disease type 1b. *Orphanet J. Rare Dis.* 2020;15(1):218.
25. Rossi A, Miele E, Fecarotta S, et al. Crohn disease-like enterocolitis remission after empagliflozin treatment in a child with glycogen storage disease type 1b: a case report. *Ital. J. Pediatr.* 2021;47(1):149.
26. Mikami M, Arai A, Mizumoto H. Empagliflozin ameliorated neutropenia in a girl with glycogen storage disease 1b. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 2021;63(11):1394–1396.
27. Halligan RK, Dalton RN, Turner C, Lewis KA, Mundy HR. Understanding the role of SGLT2 inhibitors in glycogen storage disease type 1b: the experience of one UK centre. *Orphanet J. Rare Dis.* 2022;17(1):195.
28. Hexner-Erichman Z, Veiga-da-Cunha M, Zehavi Y, et al. Favorable outcome of empagliflozin treatment in two pediatric glycogen storage disease type 1b patients. *Front. Pediatr.* 2022;10:1071464.

Table 1: Pediatric patients with GSD1b recruited for the EMPAtia/Fixnet observational substudy.

	Sex	Age (Years)	SLC374A mutation NM_001164278.1	Protein Mutation NP_001157750	G-CSF ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)			Empagliflozin ($\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)			Antibiotics requiring infections	
					0	3M	12M	0	3M	12M	1 year before	1 year after
P1	M	17	c.[1042_1043del];[1042_1043del]	p.[(Leu370Valfs)];[(p.Leu370Valfs)]	2	1	0	0.45	0.45	0.44	3	1
P2	M	3	c.[1042_1043del];[1042_1043del]	p.[(Leu370Valfs)];[(p.Leu370Valfs)]	5.4	2.5	2.5	0.3	0.3	0.27	6	4
P3	M	11	c.[898C>T];[1042_1043del]	p.[(Arg300Cys)];[(p.Leu370Valfs)]	2	0	0	0.47	0.47	0.46	7	6
P4	F	7	c.[1042_1043del];[1042_1043del]	p.[(Leu370Valfs)];[(p.Leu370Valfs)]	1	0	0	0.44	0.44	0.42	0	1
P5	M	14	c.[1015G>T];[1042_1043del]	p.[(Gly361Cys)];[(p.Leu370Valfs)]	6	0	0	0.43	0.42	0.4	1	1
P6	F	19	c.[1042_1043del];[1042_1043del]	p.[(Leu370Valfs)];[(p.Leu370Valfs)]	4	0	0	0.3	0.3	0.27	4	0
P7	F	8	c.[1015G>T];[1042_1043del]	p.[(Gly361Cys)];[(p.Leu370Valfs)]	2	1	0	0.3	0.3	0.27	2	0

Table 2: Effect of G-CSF and empagliflozin on neutrophils.

	Control donors	Patients			Patients vs Control donors (P values)			Empagliflozin vs G-CSF (P values)		Correlation with [plasma 1,5-AG] (P values)
		Under G-CSF (0)	3 months (3M)	12 months (12 M)	G-CSF vs control	3M vs control	12M vs control	3M vs G-CSF	12M vs G-CSF	
Number of samples	11	7	7	6						
Sex	6M / 5F	4M / 3F	4M / 3F	3M / 3F						
Age (Years)	14 (9-17)	11.5 (7.5-15.5)								
Severe infections / years	n.d.	3 (1.5-5)		1 (0.5-2.5)			<i>n.d.</i>		<i>n.d.</i>	0.0582
[plasma 1,5-AG] (µg/ml)	n.d.	47.2 (43.35-52.95)	6.2 (2.85-11.2)	5.3 (4.6-9.45)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<0.0001	<0.0001	
[plasma G-CSF] (ng/ml)	17.9 (15.8-20.8)	135.0 (46.9-147.9)	43.1 (23.8-72.3)	21.4 (18.5-29.9)	<0.0001	0.2546	0.9669	0.2467	0.09	
Leukocytes count (× 1000 cells/µL)	6.21 (5.83-7.46)	2.55 (2.24-4.55)	4.4 (3.76-6.92)	3.98 (3.62-4.34)	0.0021	0.38	0.0875	0.0352	0.3783	0.0473
Neutrophils count (× 1000 cells/µL)	3.10 (2.69-3.61)	0.86 (0.58-1.18)	1.95 (1.44-2.78)	2.24 (2.13-2.50)	0.001	0.2347	0.3247	0.0699	0.0945	0.018
Lymphocytes count (× 1000 cells/µL)	2.24 (1.8-3.10)	1.59 (1.18-2.52)	1.83 (1.56-3.15)	1.26 (1.12-1.83)	0.2934	0.8721	0.2044	0.1034	0.7548	0.3620
Monocytes count (× 1000 cells/µL)	0.56 (0.51-0.64)	0.26 (0.21-0.44)	0.30 (0.25-0.49)	0.32 (0.30-0.39)	0.0875	0.4193	0.6111	0.1354	0.4787	0.1945
Healthy - Annexin V negative (neutrophils %)	77.0 (73.2-78.2)	34.8 (30.9-76.3)	61.7 (44.9-71.3)	67.8 (57.1-1-74.6)	0.0183	0.0605	0.5127	0.9597	0.5335	0.1979
Apoptotic - Annexin V positive (neutrophils %)	23.0 (19.7-27.5)	65.1 (23.5-68.5)	38.3 (28.7-55.1)	32.2 (25.2-42.8)	0.0181	0.0567	0.4961	0.9643	0.5381	0.1915
Migration (cells)	1010 (936-1201)	192 (124-420)	350 (196-450)	616 (558-653)	<0.0001	<0.0001	0.0132	0.9083	0.1676	0.4290
Chemotaxis response to 10 % HS (Cells)	3735 (3071-4828)	1546 (1343-2298)	3110 (2837-4462)	3513 (2924-4065)	0.0345	0.9977	0.9971	0.0844	0.0293	0.0457
NETosis (PMA induction fold)	4.33 (2.84-4.77)	1.03 (0.98-1.07)	1.16 (1.05-1.27)	1.58 (1.41-1.80)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1826	0.02	0.0007
Phagocytosis of <i>S. aureus</i> bioparticles (FU)	3352 (2471-4440)	1365 (774-1424)	1809 (1342-2046)	2470 (1904-2920)	<0.0001	0.0143	0.1231	0.1656	0.028	0.0328
Oxidative burst - Index DHR (%)	<i>n.d.</i>	0.89 (0.845-0.955)	<i>n.d.</i>	0.96 (0.93-1.015)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.1292	0.1905
Oxidative burst - Index DHR (FMI)	<i>n.d.</i>	0.97 (0.955-0.985)	<i>n.d.</i>	0.94 (0.925-1.01)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.9444	0.5977
[cell. MPO] (ng/µg)	55.3 (40.5-63.0)	47.3 (37.2-53.0)	43.9 (37.4-62.0)	58.7 (46.9-61.6)	0.9485	0.8253	0.9760	0.9833	0.8152	0.2521
[cell. LTF] (ng/µg)	11.84 (10.96-13.51)	9.52 (8.24-10.82)	8.59 (6.06-8.92)	8.96 (7.72-11.72)	0.1982	0.0073	0.2876	0.3453	0.9954	0.7215
[cell. Defensins] (ng/µg)	44.2 (35.0-46.2)	56.9 (42.2-72.4)	17.15 (15.0-44.9)	22.36 (20.72-38.69)	0.2893	0.3701	0.2920	0.0451	0.0419	0.0316
[plasma LTF] (ng/ml)	0.32 (0.27-0.36)	0.74 (0.61-0.83)	0.19 (0.15-0.21)	0.18 (0.10-0.34)	<0.0001	0.1757	0.4234	0.0061	0.0045	0.0005
[plasma Defensins] (ng/ml)	0.53 (0.33-0.82)	3.06 (2.24-3.21)	2.25 (1.46-2.31)	1.17 (1.01-1.60)	<0.0001	0.0003	0.0759	0.0098	0.0121	0.2356
[plasma CAMP/LL37] (ng/ml)	7.16 (5.38-8.03)	1.36 (0.48-3.83)	1.04 (0.165-2.12)	0.29 (0-1.36)	0.0005	<0.0001	<0.0001	0.5726	0.4034	0.8343

Figures and tables legends

Table 1: Pediatric patients with GSD1b recruited for the EMPAtia/Fixnet observational substudy.

Table 2: Effect of G-CSF and empagliflozin on neutrophils.

Results are presented as median values with Q1 and Q3. Statistically significant differences between patients and healthy controls were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment. The potential correlation between each parameter and [plasma 1,5-AG] were analyzed by two-tailed Spearman correlation assay.

Figure 1: Empagliflozin lowers [plasma 1,5-AG] and increases the neutrophil count.

(A, B) The plasma concentration of 1,5-AG was determined before and 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment in seven GSD1b patients and 11 healthy controls: (A) median \pm quartiles for the patients and controls, and (B) individual patient profiles. (C, D) Neutrophil counts: (C) median \pm quartiles for the patients and controls, and (D) individual profiles. (E) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and neutrophil count. (F) median \pm quartiles of leukocyte count for the patients and controls, and (G) individual patient profiles. (H) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and leukocyte count. (I) median \pm quartiles of lymphocyte count for the patients and controls, and (J) individual profiles. (K) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and lymphocyte count. (L) median \pm quartiles of monocytes count for the patients and controls, and (M) individual profiles. (N) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and monocyte count. Statistically significant differences between patients and healthy controls (black) were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment (blue). For clarity, only P values < 0.5 are shown.

Figure 2: Effect of empagliflozin on neutrophil viability and the chemotactic response.

(A-F) Cell viability and the frequency of apoptosis in freshly isolated neutrophils were determined in seven GSD1b patients and 11 healthy controls at three time points by labeling with annexin V. (A) Median \pm quartiles of neutrophil viability for the patients and controls, and (B) individual profiles. (D) Median \pm quartiles of apoptotic frequency for the patients and controls, and (E) individual profiles. Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and neutrophil viability (C) and apoptosis (F). (G-L) The mobility and chemotactic response of neutrophils determined in a Boyden's chamber model with or without human serum. (G) Median \pm quartiles of the number of migrating neutrophils in the absence of human serum for the patients and controls, and (H) individual profiles. (J) Median \pm quartiles of the number of migrating neutrophils in response to human serum for the patients and controls, and (K) the individual profiles. Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and (I) neutrophil mobility and (L) chemotactic response. Statistically significant differences between patients and healthy controls (black) were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment (blue). For clarity, only P values < 0.5 are shown.

Figure 3: Effect of empagliflozin on the oxidative burst response and intracellular MPO concentration in neutrophils.

(A-F) The neutrophil oxidative burst response to PMA stimulation in the seven GSD1b patients and 11 healthy controls determined using a DHR assay. (A) Median \pm quartiles of the percentage of responsive cells (DHR index) for the patients and controls, and (B) the individual profiles. (D) Median \pm quartiles of fluorescence medium intensity (DHR index FMI) for the same neutrophils, and (E) the individual profiles. Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and (C) DHR index and (F) DHR index FMI. (G) Representative flow cytometry analysis for a control donor and *patient 2*. (H,I) Intracellular MPO concentrations determined by ELISA: median \pm quartiles of (H) [MPO] for the patients and controls, and (I) the individual profiles. (J) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and [intracellular MPO]. Statistically significant differences between patients and healthy controls (black) were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months

after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment (blue). For clarity, only P values < 0.5 are shown.

Figure 4: Effect of empagliflozin on phagocytosis and NETosis.

(A-C) The phagocytic activity of freshly isolated neutrophils was determined in the seven GSD1b patients and 11 healthy donors at three time points using pH-sensitive particles of *Staphylococcus aureus*: (A) median \pm quartiles of phagocytosis (fluorescence units) for the patients and controls, and (B) the individual profiles. (C) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and neutrophil phagocytosis. (D-F) NET production determined by the quantification of extracellular DNA before and after PMA stimulation: (D) median \pm quartiles of NETosis induction for the patients and controls, and (E) the individual profiles. (F) Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] and neutrophil NETosis. (G) Representative confocal images of NETosis based on the labeling of DNA (blue) and neutrophil elastase (pink). The scale bar represents 20 μ M and white arrows indicate NETs structures. Statistically significant differences between patients and healthy controls (black) were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment (blue). For clarity, only P values < 0.5 are shown.

Figure 5: Effect of empagliflozin on intracellular and plasma AMPs.

(A) Median \pm quartiles of [intracellular LTF] for the seven GSD1b patients and 11 healthy controls, and (B) the individual profiles. (E) Median \pm quartiles of [intracellular defensins] for the patients and controls, and (F) the individual profiles. (I) Median \pm quartiles of [plasma LTF] for the patients and controls, and (J) the individual profiles. (M) Median \pm quartiles of [plasma defensins] for the patients and controls, and (N) the individual profiles. (Q) Median \pm quartiles of [plasma LL-37] for the patients and controls, and (R) the individual profiles. Spearman correlation analysis between [plasma 1,5-AG] or [plasma G-CSF] and [intracellular LTF] (C and D), [intracellular defensins] (G and H), [plasma LTF] (K and L), [plasma defensins] (O and P) and [plasma LL-37] (S and T). Statistically significant differences between patients and healthy controls (black) were determined by ordinary one-way ANOVA for unpaired data, whereas mixed-effect analysis for paired data was used to compare values 3 and 12 months after the start of empagliflozin treatment to values obtained before the start of treatment (blue). For clarity, only P values < 0.5 are shown.

Figure 1

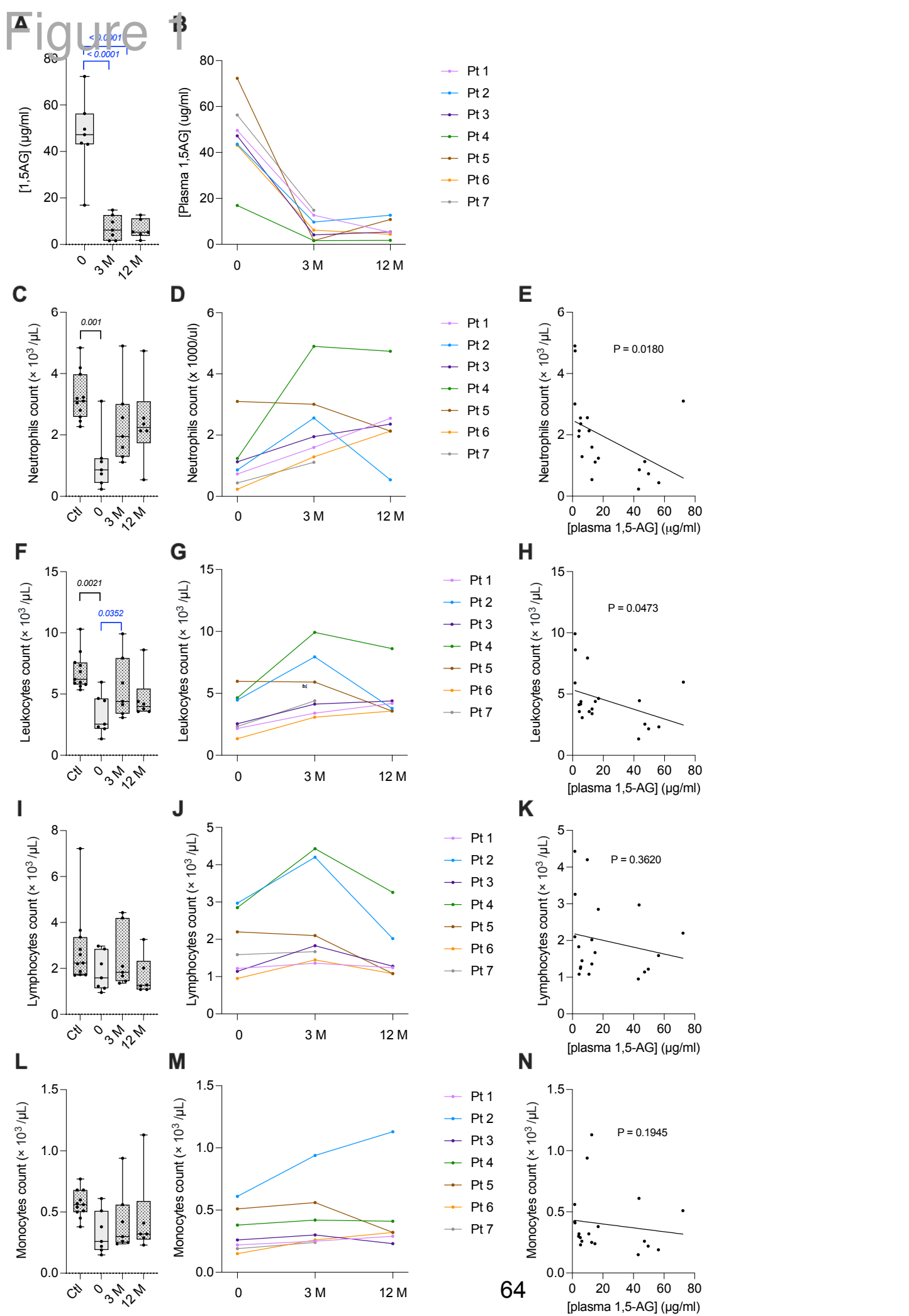


Figure 2

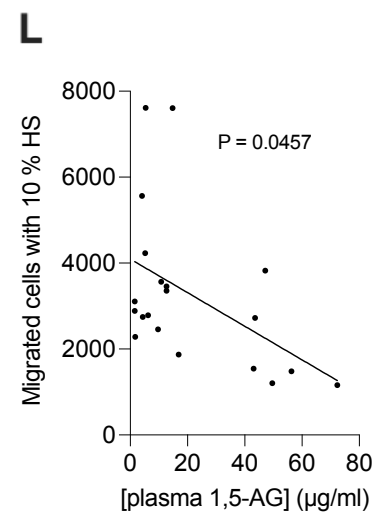
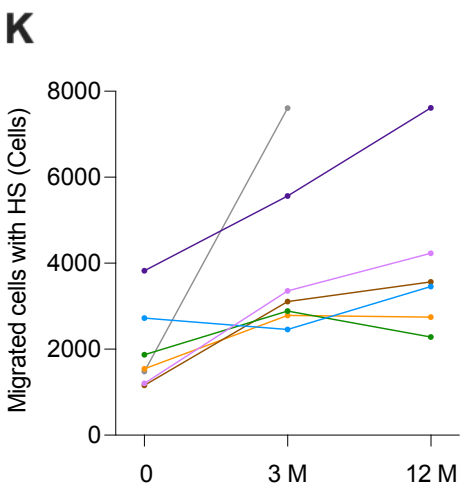
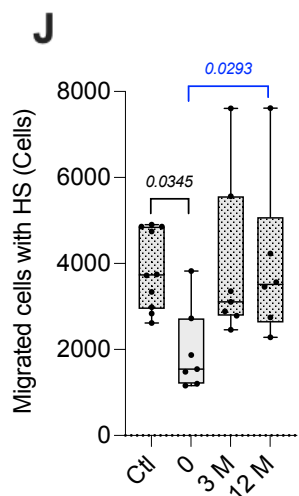
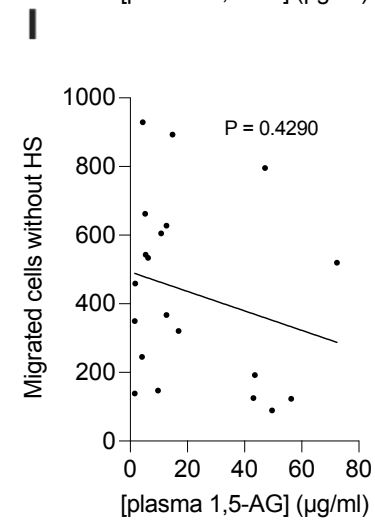
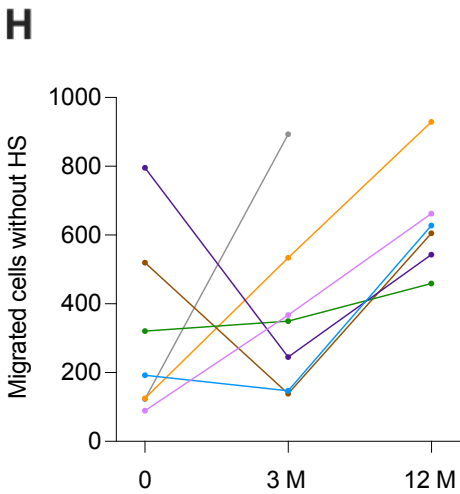
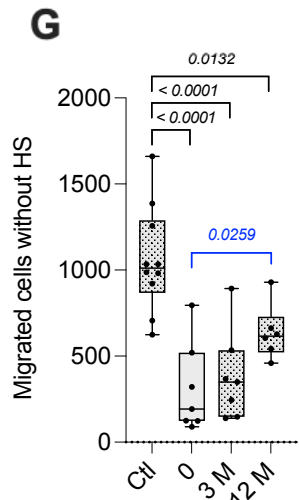
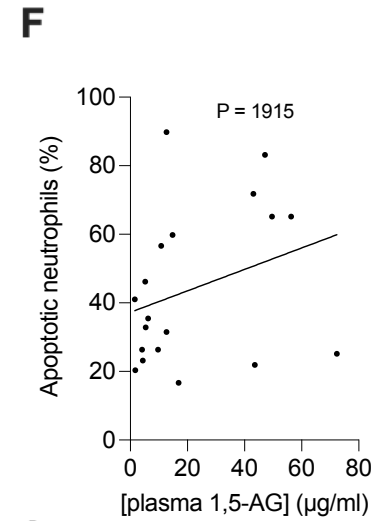
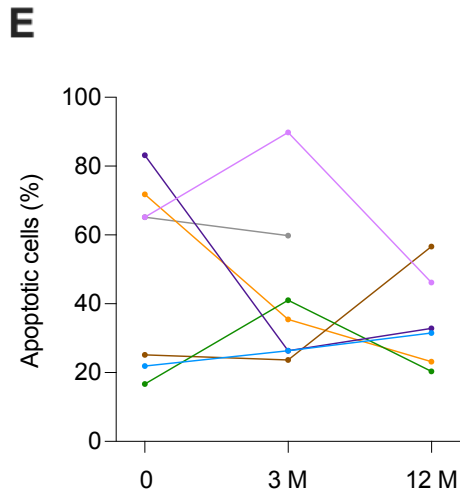
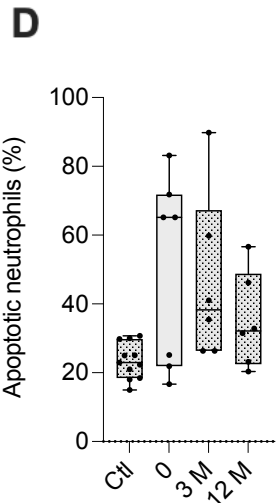
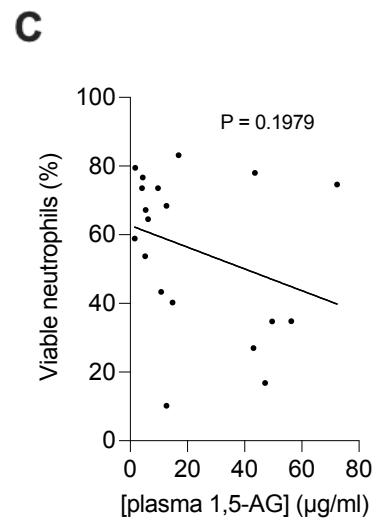
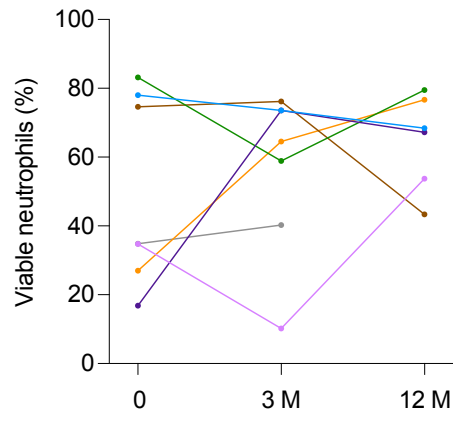
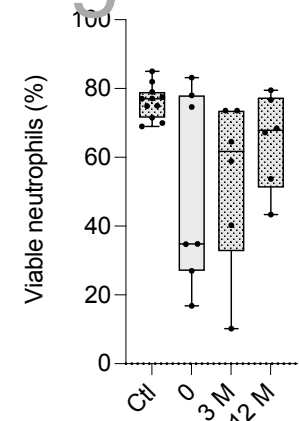


Figure 3

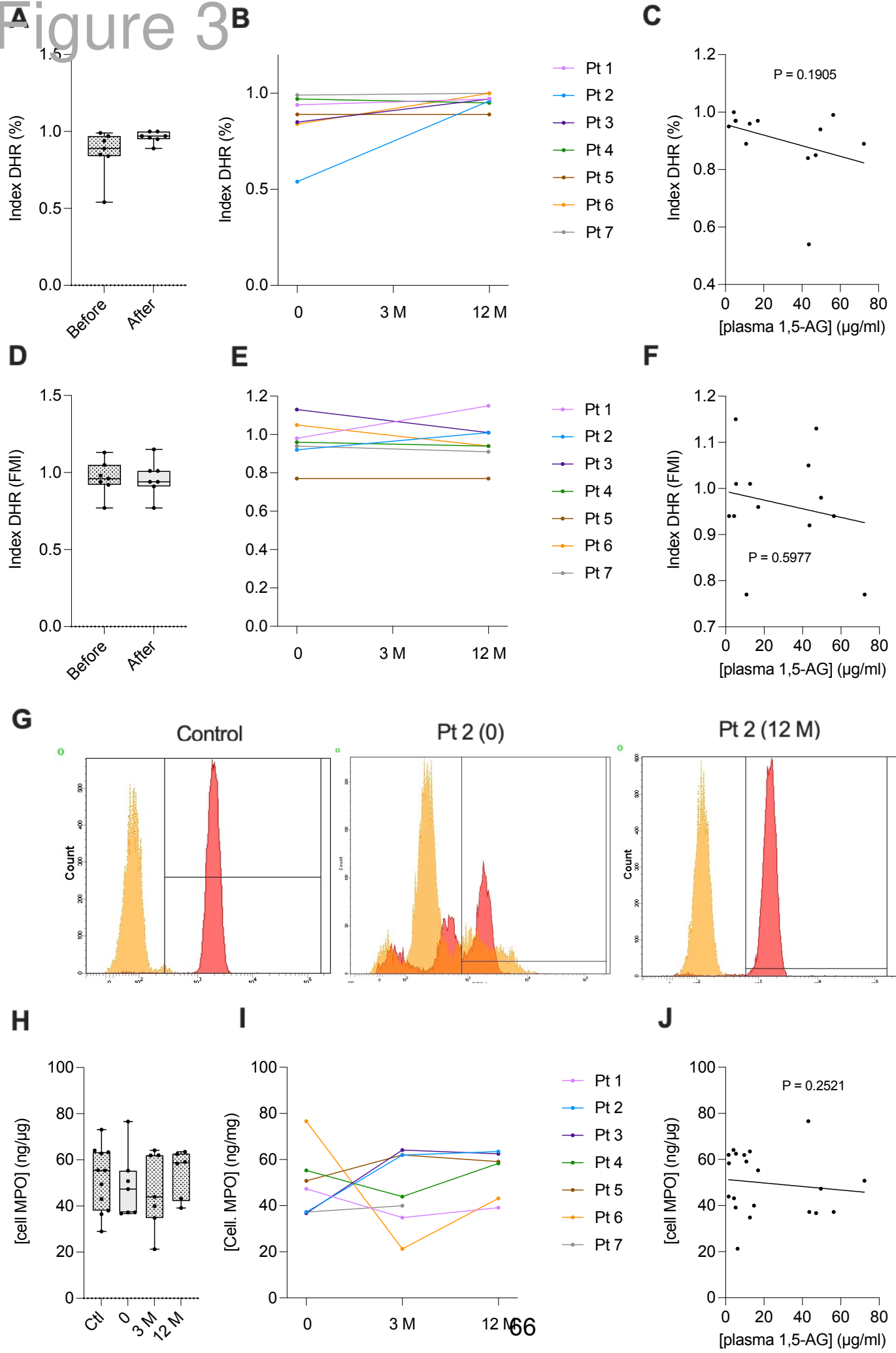


Figure 4

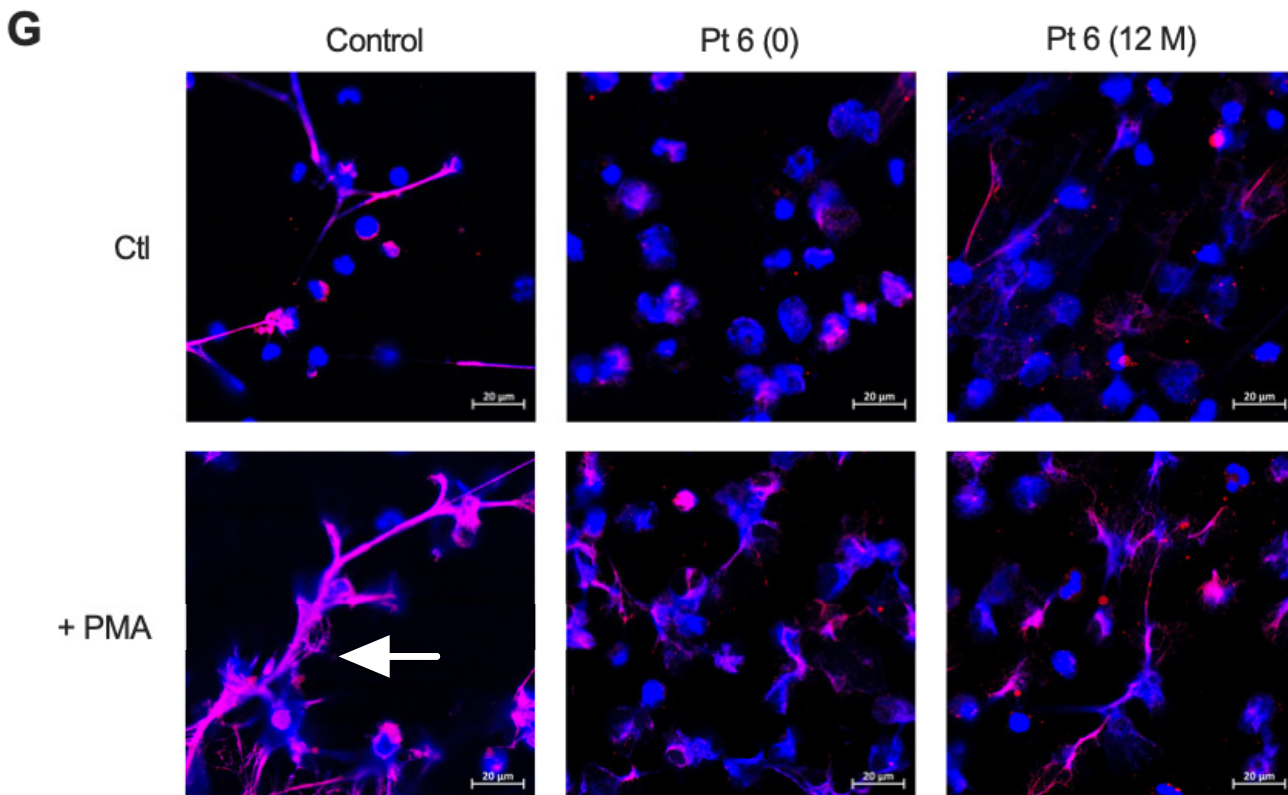
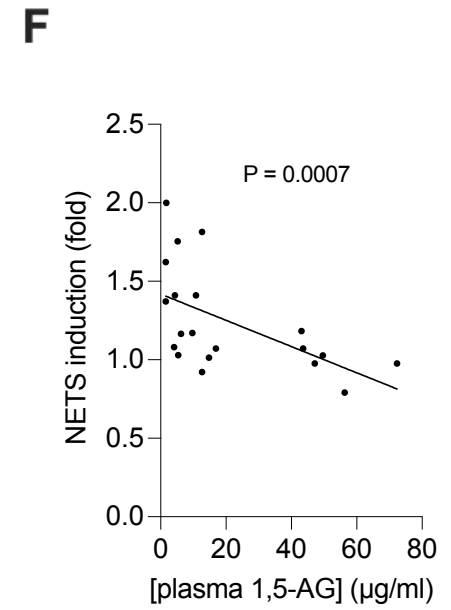
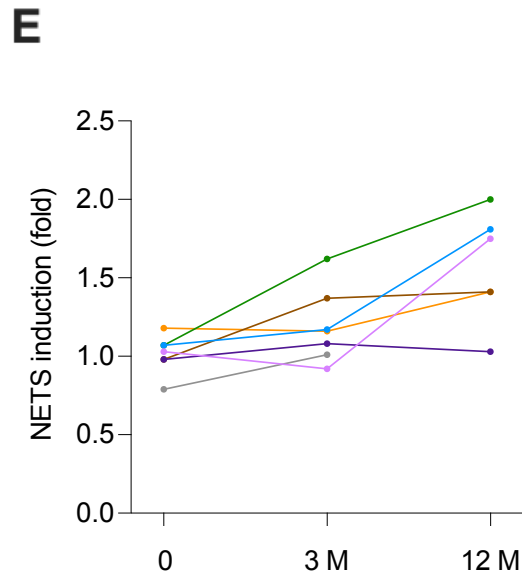
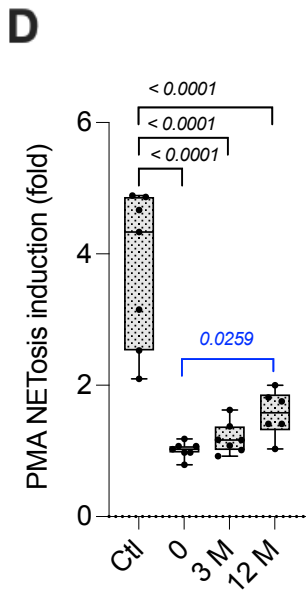
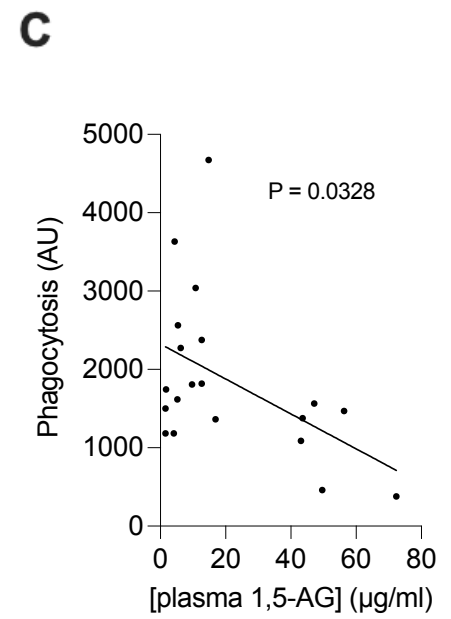
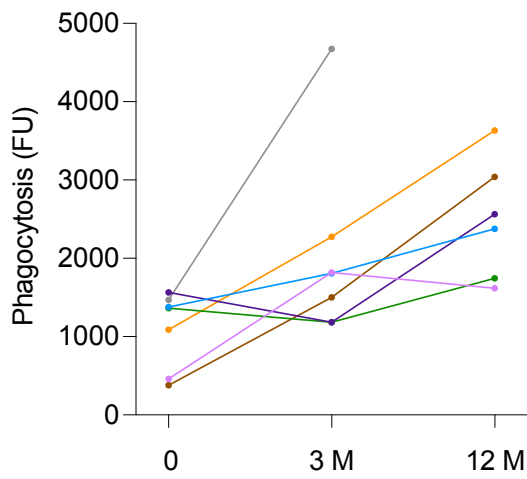
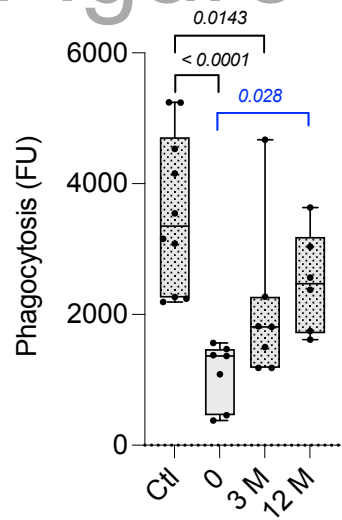
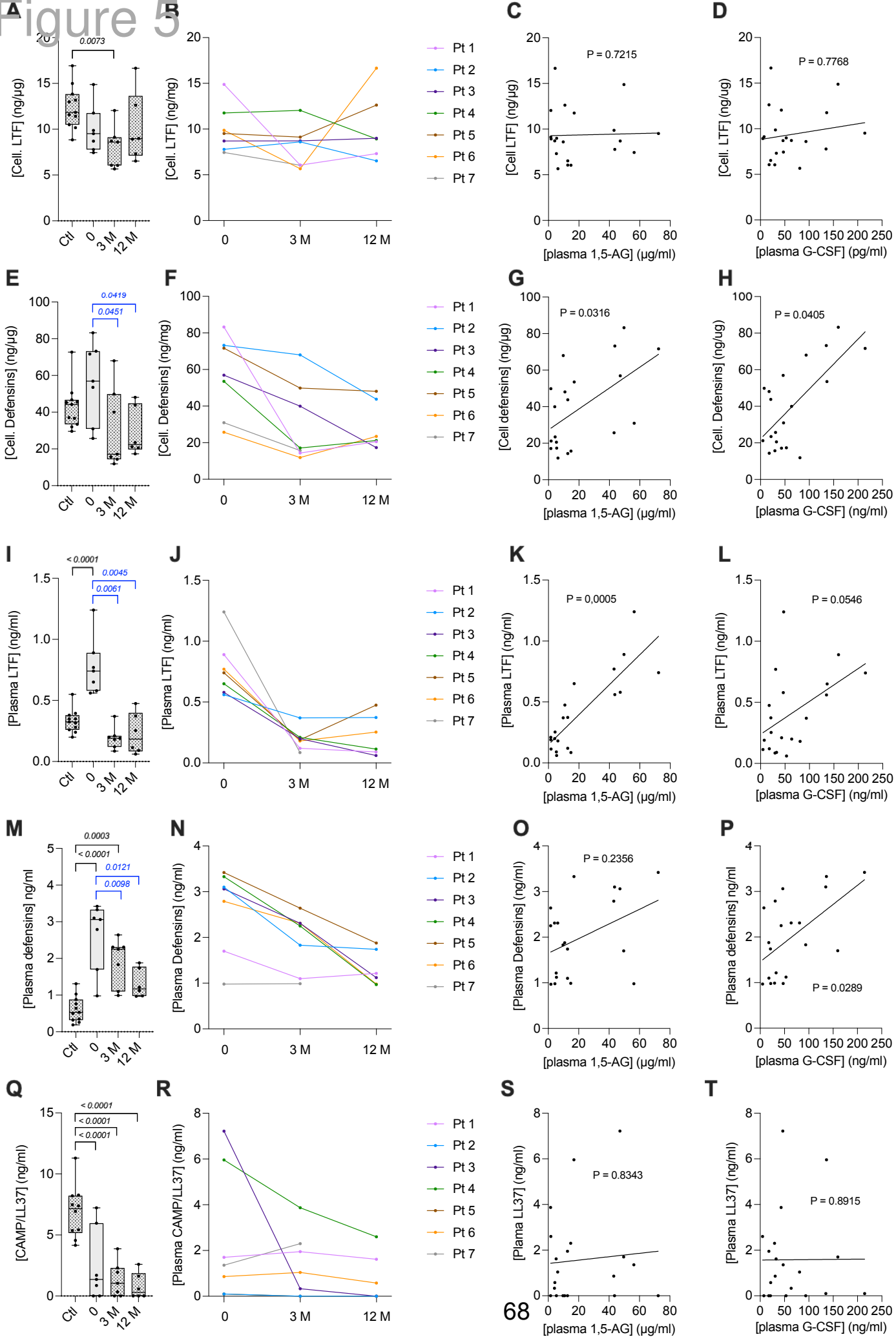


Figure 5



Clinical characteristics and long-term outcomes of patients with glycogen storage disease type 1b: a retrospective multi-center experience in Poland

Charakterystyka kliniczna i długoterminowe wyniki pacjentów z glikogenezą typu 1b: retrospektywne doświadczenie wieloośrodkowe w Polsce

¹Magdalena Kaczor, ¹Dorota Wesół-Kucharska, ¹Milena Greczan, ²Karolina Kierus, ³Łukasz Kałużny, ³Monika Duś-Żuchowska, ¹Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga, ⁴Elżbieta Ciara, ¹Janusz Książczyk, ¹Dariusz Rokicki

¹Department of Pediatrics, Nutrition and Metabolic Disorders, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

²Department of Pediatrics, Rheumatology, Immunology and Metabolic Bone Diseases, Medical University of Białystok Children's Clinical Hospital of I. Zamenhof, Białystok, Poland

³Department of Pediatric Gastroenterology and Metabolic Disorders, Pediatric Institute, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

⁴Department of Molecular Genetics, Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

Abstract

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is an inherited metabolic defect caused by a deficiency of microsomal glucose-6-phosphate (G6P) transport protein across the endoplasmic reticulum membrane. Patients with GSD 1b have hypoglycemia episodes, lactate acidosis, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, hyperuricemia, neutropenia and in imaging studies hepatomegaly and/or nephromegaly.

The primary goals of treatment are to maintain proper blood glucose levels and to increase the number of properly functioning neutrophils.

The aim of the study was a retrospective analysis of the clinical picture and treatment results of pediatric patients with type 1b glycogen storage disease from Poland.

The study included 13 patients from 3 clinical centers, with a median age at diagnosis as 5 months. In 11/13 patients, the diagnosis was confirmed by molecular test, by the presence of pathogenic variants on both alleles of the *SLC37A4* gene. Ten out of 13 patients developed the first symptoms in the form of severe infection (sepsis and/or pneumonia) already in the neonatal-infant period. A hypoglycemia episode was observed before diagnosis in 8/13 patients, of which 4/8 patients presented symptoms in the form of generalized relaxation and/or seizures. Two patients developed hypertension, and 4/13 required long-term treatment of inflammatory bowel disease.

Key words:

glycogen storage disease type 1b, glycogenesis 1b, *SLC37A4*, neutropenia, filgrastim, inflammatory bowel disease.

Introduction

Glycogen storage disease type 1b (GSD 1b) is a rare inherited metabolic defect caused by a deficiency of the microsomal glucose-6-phosphate (G6P) transport protein across the endoplasmic reticulum (RE) membrane. Glucose-6-phosphate is found in the RE, which converts G6P into glucose [1, 2].

A transporting protein deficit results in the excessive accumulation of G6P in the cytoplasm, which hinders the ability to

obtain glucose in the process of gluconeogenesis, as well as excessive stimulation of the glycolysis process and the pentose phosphate cycle. Excess substrate in the first process induces pyruvate overproduction, which through the Krebs cycle stimulates lipogenesis and thus triglyceride and cholesterol production. Pyruvate, which is not metabolized during the Krebs cycle, is converted to lactate. The excess G6P also causes increased activity of the pentose phosphate cycle, which triggers excessive uric acid accumulation.

The above abnormalities in patients with GSD 1b result in hypoglycemia episodes, which due to the ketone bodies generated are often asymptomatic [2]. In laboratory tests, untreated patients show typical abnormalities: lactic acidosis, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and hyperuricemia [2]. Furthermore, excessive accumulation of lipids and glycogen in the liver and kidneys causes damage to these organs and organomegaly [2]. The initially observed hyperaminotransferaseemia normalizes with appropriate treatment in most patients, while hepatic steatosis progresses. When patients are in their 20s and 30s, hepatic adenomas appear with an increased risk of transformation into hepatocellular carcinoma (HCC) [2]. Damage to the proximal convoluted tubule (loss of bicarbonates, glucosuria, phosphaturia, hypokalemia, aminoaciduria), the distal convoluted tubule (hypocitraturia and hypercalciuria) and glomerulus, along with fibrosis, lead to arterial hypertension and renal failure, usually manifesting in adulthood [2].

Patients with GSD 1b have an insufficient number of properly functioning neutrophils, therefore they often present with life-threatening infections in the neonatal period, and later recurrent mouth aphthae and inflammatory Crohn-like bowel diseases [2, 5]. It has recently been discovered that 1, 5-anhydroglucitol-6-phosphate accumulates in the cytoplasm of neutrophilic granulocytes of patients with GSD 1b, which results in reduced energy production and thus shorter survival and worse bactericidal activity [1, 8, 9].

Coagulation disorders (abnormal adhesion, platelet aggregation and/or “von Willebrand-like” platelet defects), osteoporosis, short stature, and excess body weight have also been reported in patients with GSD 1b [2].

GSD 1b is an autosomal recessive inherited disease. A biallelic defect of the *SLC37A4* gene is confirmation of the diagnosis. Thus far, a genotype-phenotype correlation has not been proven [3, 4].

Nutritional treatment is the primary form of intervention in GSD 1b. Frequent meals are necessary to avoid hypoglycemic episodes as well as excluding fructose and galactose from the diet. These simple carbohydrates enter the biochemical pathway above the defect, which exacerbates biochemical abnormalities, e.g. lactic acidosis. Extending the intervals between meals is achieved with a high-protein diet (up to 2 g of protein/kg) and the supply of raw corn starch, which is a source of slowly digestible carbohydrates. Additionally, in patients with

chronic hyperuricemia, allopurinol is used, and in the case of persistent hypertriglyceridemia fibrates drugs. Most patients require antihypertensive treatment; ACEIs and/or ARBs are recommended in the presence of glomerular hyperfiltration [2].

Due to neutropenia, patients with GSD 1b usually require treatment with granulocyte-colony growth factor (G-CSF, filgrastim), which limits infections but does not eliminate them. Despite the use of G-CSF, severe life-threatening infections, impaired wound healing, recurrent mouth aphthae, and severe diarrhea (Crohn-like disease) are still observed. Moreover, this drug is not without side effects, such as bone and joint pain, epistaxis, gingival hypertrophy, splenomegaly, or a greater risk of hematopoietic cancers [6, 7]. Recently, attention has been paid to SGLT2 inhibitors, which reduce 1,5-anhydroglucitol-6-phosphate concentrations in the neutrophil cytoplasm, which unblocks energy production in the cell, prolongs survival, and improves neutrophil function [8, 9].

Aim of the study

The aim of the study was a retrospective analysis of the clinical picture and treatment results of patients with glycogen storage disease type 1b, remaining under the care of the Department of Pediatrics, Nutrition and Metabolic Disorders at the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw, as well as the Department of Pediatrics, Rheumatology, Immunology and Metabolic Bone Diseases at the Medical University of Białystok Children’s Clinical Hospital of I. Zamenhof and the Department of Pediatric Gastroenterology and Metabolic Disorders at the Pediatric Institute of the Poznań University of Medical Sciences.

Materials and methods

A retrospective analysis of the clinical course of patients with glycogen storage disease type 1b, who in 2021 were under the care of three medical institutions in Poland, was performed.

A total of 13 patients (5 girls and 8 boys) were enrolled in the study. The median age at which the diagnosis was made was 5 months (range: 1 month – 2 years) (Table I). All patients were diagnosed on the basis of the clinical picture and typical abnormalities in laboratory tests. In 11/13 patients, GSD1b was confirmed by molecular test.

The study took into account the clinical condition and abnormalities in laboratory and imaging tests at the time of diagnosis. The course of the disease was analyzed in all patients, paying particular attention to the age at diagnosis and neutropenia severity, the first symptoms of inflammatory bowel disease, hypertension development, and the treatment used.

Results

The first symptoms in the form of severe infection (sepsis and/or pneumonia) were developed by 10/13 patients, mostly already in the neonatal-infant period (median age was 20 days, range: first 24 h – 21/12) (Table I). The majority (11/13) of pa-

Table I. Characteristics of the studied patients – age symptoms appeared

Median age at diagnosis (months)	5
Median age of first severe infection – sepsis and/or pneumonia (days of life)	20
Median age of first hypoglycemia episode (months)	3.5
Median age of hepatomegaly diagnosis (months)	4

tients had hepatomegaly prior to diagnosis, observed from median age of 4 months (range: 9th day of life – 9 months) (Table I). Only in 4/13 patients hepatomegaly was associated with nephromegaly – and if it was, it was observed later – median age was 7 months (range: 3–9 months).

Before diagnosis, a hypoglycemia episode (serum glucose 9–26 mg/dl, median 11 mg/dl) was observed in 8/13 patients (Table I), of which 4/8 patients presented symptoms in the form of generalized relaxating and/or seizures.

At diagnosis, the most common biochemical abnormalities in 12/13 patients were lactate acidosis (median 55 mg/dl (normal < 19.8 mg/dl), range 26–126 mg/dl) and hypertriglyceridemia (median 531 mg/dl, range 246–3181 mg/dl) (Table II, III). Hypertransaminasemia was found in 8/13 patients and the maximum value was AST/ALT 628/515 IU/l.

Pre-diagnosis laboratory tests showed neutropenia in only three patients. However, at diagnosis it was found in 9/13 patients (median neutrophil count 200 cells/ul, 20–954 cells/μl) (Table II). The number of patients (9/13) who developed severe pneumonia and/or sepsis at 1 years old suggests that neutropenia occurred much earlier. Most likely, this had not been found previously because blood counts were performed at the time of infection symptoms, when increased secretion of these cells from the bone marrow is observed in patients with GSD 1b.

Hyperuricemia at diagnosis in the described patients was mild and was observed only in 5/13 (median: 8 mg/dl, range 7–8.3 mg/dl) (Table II).

Ultrasound examination at diagnosis revealed enlarged liver in 12/13 patients, and in 6/12 cases increased echogenicity of its parenchyma (Tables I, III). Hepatomegaly was accompanied by nephromegaly in 2/12 patients (in one case with increased echogenicity of the renal parenchyma).

In 11/13 patients, the diagnosis was confirmed by molecular test; the most common variant was the homozygous c.1042_1043 del (7/13 patients) (Tables III, IV). Comparing the course of the disease in patients with the same mutation is extremely difficult, among others, due to the small size of the group, the significant age differences (11 years between the oldest and the youngest patients), or the differences in compliance with dietary recommendations. However, it appears that no genotype-phenotype correlation can be found, as there were significant differences between the age of onset and the severity of subsequent clinical and biochemical abnormalities (Table IV).

From the moment of diagnosis, all patients were on a diet restricted in easily digestible carbohydrates (fructose and galactose) under the control of a clinical dietitians. From 2015, all patients were on a high-protein diet (up to 2 g of protein/kg). To extend the intervals between meals, raw corn starch was used (on average 1.2 g/kg of b.w./meal), in 2/13 patients Glycosade® was used with good tolerance.

Difficulties in frequent administration of meals orally, and thus inability to maintain normal blood glucose levels, necessitated a gastrostomy in 5/13 patients (median age at surgery was 17 months, range 5 months – 4 years). In 2/5 of these cases, the postoperative course was complicated by impaired

Table II. Characteristics of the studied patients – laboratory tests confirmed at diagnosis

Deviation in laboratory test	Number of patients	Median concentration (concentration range)
Increased lactic acid concentration (N: < 19.8 mg/dl)	12/13	55 mg/dl, 26–126 mg/dl
Increased triglyceride levels (N: < 150 mg/dl)	12/13	531 mg/dl, 246–3181 mg/dl
Decreased neutrophil count (N: to 4 y.o. < 1000, over 1500 cells/μl)	9/13	200 cells/μl 20–954 cells/μl
Increased uric acid levels (N: < 7 mg/dl)	5/13	8 mg/dl, 7–8.3 mg/dl
N: norm		

wound healing. Due to recurrent infections in the gastrostomy area, one patient had to have the gastrostomy removed, and after many months of nutrition therapy adequate oral intake was obtained.

Additionally, 12/13 patients required filgrastim (G-CSF) due to severe neutropenia (Tables III, V). At diagnosis, a decreased number of neutrophils was observed in 9/13 patients; the median age of G-CSF initiation was 22 months (range: 4 months – 11 years). Despite G-CSF use and a satisfactory number of neutrophils obtained in this way, patients still developed more frequent and more severe infections than their peers, as well as recurrent mouth aphthae (5/12) and diarrhea (6/12) (Table VI). All patients with an increased number of stools and/or pathological stool content underwent colonoscopy, which revealed rectal ulcers (in one patient reaching up to the cecum). Thus, in these patients, mesalazine was added to the treatment (median age at start was 5.5 years, range: 2.5–9 years) (Table V). In 2/6 of patients, the drug was used for six months, and due to lack of changes in the colonoscopy check-up exam, the drug was discontinued, and the symptoms have not yet returned.

In 3/13 patients, due to persistent neutropenia despite treatment, empagliflozin was started off label (Tables III, V). After an average of one year of use, there was an improvement in the number of infections, inflammatory bowel disease severity, and mouth aphthae frequency, with no significant side effects.

The longest follow-up period was 17 years (median follow-up was 10 years, range: 6 months – 17 years), during which time we observed that adherence to dietary recommendations with regard to the composition and frequency of meals normalized the concentrations of lactates and aminotransferases (AST/ALT) in the serum in all patients. However, elevated uric acid levels persisted chronically in 7/13 patients. Therefore,

Table III. Characteristics of GSD 1b patients – summary

Patients	Sex	Age at diagnosis (months)	Molecular analysis	Initial symptoms (from the earliest)	Lactate at diagnosis (N < 19.8 mg/dl)	Uric Acid at diagnosis (N < 7.0 mg/dl)	Triglycerides at diagnosis (N < 150 mg/dl)	IBD	Hyper-tension	Duration of follow-up (years)	Drugs currently
GN	K	5	c.1042_1043del	INF, HMG	31	N	1064	-	-	17	G-CSF, ALL
LP	M	4	c.1042_1043del	INF, HMG, HGL	N	N	246	+	-	16.5	EMPA, MES, bisphosphonate
SK	M	2.5	c.1042_1043del	INF, HMG, HGL	28	N	N	-	+	15	G-CSF, AH
KS	M	9	c.1042_1043del c.341A>G	HGL, INF, HMG	42	N	1321	+	+	13	EMPA, ALL fibrate, AH, MES
FM	M	5	-	INF, HGL	45	N	272	+	-/+	12.5	G-CSF, ALL
MJ	M	24	c.1042_1043del	HMG, INF	116	N	3181	+	-	10	G-CSF, MES
DM	M	7	-	INF, HMG, HGL	80	8.3	453	-	-	9.5	G-CSF, ALL
ŁK	K	5	c.1042_1043del	HGL, INF	52	N	346	+	-	8	G-CSF, MES, EMPA
SN	K	1	c.1042_1043del c.1015G>T	INF, HMG	26	8.2	481	-	-	7	G-CSF, ALL
PT	M	9	c.1042_1043del	HMG	58	N	3302	-	-	6	no
PA	K	4	c.1042_1043del	INF, HMG, HGL	87	N	314	-	-	5	G-CSF, ALL
VVV	M	4	c.1043_1044del	INF, HMG	72	8.0	581	-	-	1.5	G-CSF, ALL
KA	K	2.5	c.1042_1043del c.1175del	INF	126	N	1809	-	-	0.5	G-CSF

HMG – hepatomegaly; HGL – hypoglycemia; INF – infection; G-CSF – granulocyte – macrophage colony stimulating factor; ALL – allopurinol; MES – mesalazin; EMPA – empagliflozin; AH – antihypertension drug; N – norm

they required the use of allopurinol (median age at start: 5 years, range: 1–13 years), which in a dose from 2 mg/kg/day to 6 mg/kg/day normalizes uric acid levels (Tables III, V).

One patient experienced significant hypertriglyceridemia (1020, 1100 mg/dl), which persisted despite no history of hypoglycemia, normal serum lactic acid and uric acid levels. There-

fore, at the age of 13, it was decided to include fenofibrate at a dose of 2.5 mg/kg, which resulted in a reduction in TG levels of < 500 mg/dl (Table V).

An increase of lactic acid, uric acid, AST/ALT, and triglycerides was found in the event of non-compliance with the diet, as well as during infections and perioperative periods.

Table IV. Patients with homozygotic molecular variant c. 1042_1043delCT in the *SLC37A4* gene

Patient No (current age)	Initial symptome	Lactic acid Median of check-ups (without infections)	Uric acid Median of check-ups (without infections)	TG Median of check-ups (without infections)	IBD	Hyper-tension	G-CSF Age inclusion (years)	Drugs currently
1. (17)	INF, HMG	31	ALL from 13 years of age	321	-	-	11	G-CSF, ALL
2. (17)	INF, HMG, HGL	17.7	6.5	136	+	-	2	EMPA, MES
3. (16)	INF, HMG, HGL	29	6.2	154	-	+	2	G-CSF, AH
4. (11)	HMG, INF	53	3.9	778	+	-	8	G-CSF, MES
5. (9.5)	HGL, INF	22	4.7	107.5	+	-	1.5	G-CSF, MES, EMPA
5. (6.5)	HMG	48.5	5.2	498	+/-	-	-	no
6. (6)	INF, HMG, HGL	38	ALL from 5 years of age	325	-	-	0.5	G-CSF, ALL

HMG – hepatomegaly; HGL – hypoglycemia; INF – infection

+ recognized

+/- during the observation

ALL – allopurinol, G-CSF – granulocyte colony- stimulating factor, AH – antihypertensive agents, MES – mesalazin, EMPA – empagliflozin

Table V. Pharmacological treatment used

Drug	Number of patients currently receiving pharmacological treatment	Median age at treatment initiation (years)
Filgrastim	12/13	1.75
Allopurinol	7/13	5
Mesalazine	4/13	7
Empagliflozin	3/13	13
Fenofibrate	1/13	13

Table VI. Organ complications in the studied patients

Clinical abnormalities	Number of patients with identified abnormality
Diarrhea (> 3 stools/24 h and/or presence of pathological content)	6/13
Recurrent mouth aphthae (min 1×/ 1 month)	5/13
Pharmacologically-treated hypertension	2/13
Renal failure	0
Hepatic adenomas	0

Two patients (aged 4 and 4.5 years old) developed hypertension, one of them currently (at the age of 13) requires the use of three drugs for satisfactory blood pressure control (Tables III, VI). All patients had normal renal function parameters (urea, creatinine, cystatin C, eGFR) (Table VI).

The intellectual development of most patients was normal. One patient was diagnosed with autism spectrum disorders. One patient was diagnosed with a mild intellectual disability. Four out of 13 patients were overweight (> 97pc), and 2/13 were short (< 3pc).

Two patients were diagnosed and then treated effectively due to epilepsy.

Conclusions

Despite the fact that postprandial hypoglycemia is observed in all patients with glycogen storage disease type 1b, in the discussed patients the first symptoms were most often generalized infection and/or pneumonia. Only in the following months hypoglycemia and hepatomegaly/nephromegaly were observed. Lowered blood glucose was often found only in a provocation test (prolonged fasting). This is probably due to the fact that the diagnosis was made in infancy, when the natural feeding regimen imposes frequent meals (every 2–3 hours).

References

1. Sim SW, Weinstein DA, Lee YM, et al. Glycogen storage disease type 1b: role of glucose-6-phosphate transporter in cell metabolism and function. *FEBS Lett* 2020; 594: 3–18. doi: 10.1002/1873-3468.13666.
2. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, et al.; American College of Medical Genetics and Genomics. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2014; 16: e1. doi: 10.1038/gim.2014.128.
3. Melis D, Fulceri R, Parenti G, et al. Genotype/phenotype correlation in glycogen storage disease type 1b: a multicentre study and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 501–508. doi: 10.1007/s00431-005-1657-4.
4. Matern D, Seydewitz HH, Bali D, et al. Glycogen storage disease type I: diagnosis and phenotype/genotype correlation. *Eur J Pediatr* 2002; 161 Suppl 1: S10–S19. doi: 10.1007/s00431-002-0998-5.
5. Wicker C, Roda C, Perry A, et al. Infectious and digestive complications in glycogen storage disease type 1b: Study of a French cohort. *Mol Genet Metab Rep* 2020; 23: 100581. doi: 10.1016/j.ymgmr.2020.100581.
6. Visser G, Rake JP, Labrune P, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in glycogen storage disease type 1b. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr* 2002; 161 Suppl 1: S83–S87. doi: 10.1007/s00431-002-1010-0.
7. Pinski M, Burzynski J, Yhap M, et al. Acute myelogenous leukemia and glycogen storage disease 1b. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 756–758. doi: 10.1097/00043426-200212000-00015.
8. Wortmann SB, Van Hove JLK, Derks TGJ, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b with an SGLT2 inhibitor. *Blood* 2020; 136: 1033–1043. doi: 10.1182/blood.2019004465.
9. Grünert SC, Elling R, Maag B, et al. Improved inflammatory bowel disease, wound healing and normal oxidative burst under treatment with empagliflozin in glycogen storage disease type 1b. *Orphanet J Rare Dis* 2020; 15: 218. doi: 10.1186/s13023-020-01503-8.

At present, it seems that the consequences of neutropenia have the greatest impact on the reduction of the quality of life in the described patients. Despite the use of filgrastim, patients suffered from much more severe and more frequent infections than their peers, and inflammatory bowel disease is often not properly controlled and requires additional treatment (mesalazine). Moreover, all patients reported side effects of the treatment used, including: bone and joint pain (11/12), epistaxis (3/12), and splenomegaly (9/12). Two patients had to have treatment temporarily ceased due to hypersplenism (severe thrombocytopenia; minimum number: 50 platelets/ μ l), while no patients had confirmed haematologic malignancies to date.

In recent years, due to increasing knowledge of both nutritional and pharmacological treatment in GSD 1b, glycemic control has significantly improved in patients, and thus their metabolic control (normalization of lactic acid, uric acid, triglycerides, and aminotransferases). In view of the extremely promising reports on the treatment of neutropenia with empagliflozin in patients with GSD 1b, further studies are required. It would be extremely important to create recommendations regarding the monitoring (including the frequency of bone marrow biopsies) and treatment of neutropenia in GSD 1b with G-CSF and/or empagliflozin.

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstawanie pracy

1) Clinical characteristics and long-term outcomes of patients with glycogen storage disease type 1b: a retrospective multi-center experience in Poland

Kaczor M., Wesół- Kucharska D., Greczan M, Kierus K, Kałużny Ł, Duś- Żuchowska M., Ehmke vel Emezyńska E., Ciara E., Rokicki D., Książyk J.

Pediatr Endocrinol Diabetes Metab. 2022;28(3):207-212. doi: 10.5114/pedm.2022.116115. PMID: 35620924; PMCID: PMC10214975.

Punkty MNiSW: 70

Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Pomysłodawca publikacji, rekrutacja pacjentów, gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów, korespondencja z wydawnictwem</i>	<i>Magdalena Kaczor</i>
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>D. Kucharska</i>
Milena Greczan	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>Milena Greczan</i>
Karolina Kierus	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych</i>	<i>K. Kierus</i>
Ewa Ehmke vel Emezyńska	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>E. Ehmke</i>
Elżbieta Ciara	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>E. Ciara</i>
Dariusz Rokicki	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>D. Rokicki</i>
Janusz Książyk	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>J. Książyk</i>

2) Przełom w leczeniu glikogenozy 1b?

Kaczor M., Wesół- Kucharska D., Greczan M., Rokicki D., Książek J.

Klinika Pediatria vol 30 neurometabolizm 2022, strony 6021- 6024

Punkty MNiSW: 5.00

Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Pomysłodawca publikacji, przeгляд piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	<i>Magdalena Kaczor</i>
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Przeгляд piśmiennictwa, merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>Dorota Kucharska</i>
Milena Greczan	<i>Przeгляд piśmiennictwa, merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>Milena Greczan</i>
Dariusz Rokicki	<i>Współpomysłodawca manuskryptu merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>Rokicki</i>
Janusz Książek	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>JK</i>

3) Sodium-glucose cotransporter type 2 channel inhibitor: Breakthrough in the treatment of neutropenia in patients with glycogen storage disease type 1b?

Kaczor M, Greczan M, Kierus K, Ehmke Vel Emczyńska-Seliga E, Ciara E, Piątosa B, Rokicki D, Książyk J, Wesół-Kucharska D.

JIMD Rep. 2022 Mar 2;63(3):199-206. doi: 10.1002/jmd2.12278. PMID: 35433171; PMCID: PMC8995836

Punkty MNiSW: 5.00

Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Pomysłodawca manuskryptu, gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów; korespondencja z wydawnictwem</i>	<i>Magdalena Kaczor</i>
Milena Greczan	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, korekta manuskryptu</i>	<i>Milena Greczan</i>
Karolina Kierus	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników</i>	<i>Kierus</i>
Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników</i>	<i>Ewa</i>
Elżbieta Ciara	<i>Wykonanie analizy wyników, merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>Elżbieta Ciara</i>
Barbara Piątosa	<i>Wykonanie analizy wyników, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>Barbara Piątosa</i>
Dariusz Rokicki	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>Dariusz Rokicki</i>
Janusz Książyk	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	<i>Janusz Książyk</i>
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Gromadzenie danych klinicznych i wyników badań dodatkowych, wykonanie analizy wyników, korekta manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów; korespondencja z wydawnictwem</i>	<i>D. Kucharska</i>

4) Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin.


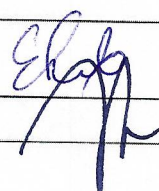
Kaczor M, Malicki S, Folkert J, Dobosz E, Bryzek D, Chruścicka-Smaga B, Greczan M, Wesół-Kucharska D, Piatosa B, Samborowska E, Madzio J, Książyk J, Ehmke vel Emczyńska- Seliga E, Hajdacka M, Potempa J, Młynarski W, Rokicki D, Veillard F. Blood Adv. 2024 Mar 26: bloodadvances.2023012403. doi: 10.1182/ bloodadvances. 2023 012403. PMID: 38531056. Impact factor: 7.5

Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, rekrutacja pacjentów, gromadzenie danych klinicznych i wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	<i>Magdalena Kaczor</i>
Stanisław Malicki	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	<i>Malicki</i>
Florian Veillard	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów, korespondencja z wydawnictwem</i>	
Wojciech Młynarski	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu korespondencja z wydawnictwem</i>	
Milena Greczan	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	<i>D. Kucharska</i>
Barbara Piatosa	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	
Emilia Samborowska	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań</i>	<i>Emilia Samborowska</i>
Janusz Książyk	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Ewa Ehmke vel Emczyńska- Seliga	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Małgorzata Hajdacka	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dariusz Rokicki	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	

4) Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin.

Kaczor M, Malicki S, Folkert J, Dobosz E, Bryzek D, Chruścicka-Smaga B, Greczan M, Wesół-Kucharska D, Piatosa B, Samborowska E, Madzio J, Książyk J, Ehmke vel Emczyńska- Seliga E, Hajdacka M, Potempa J, Młynarski W, Rokicki D, Veillard F. Blood Adv. 2024 Mar 26: bloodadvances.2023012403. doi: 10.1182/ bloodadvances. 2023 012403. PMID: 38531056.

Impact factor: 7.5

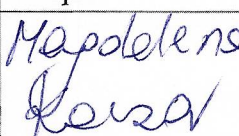
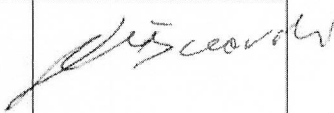
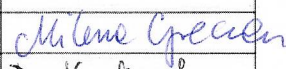
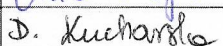
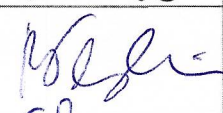
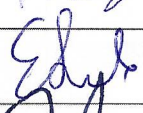
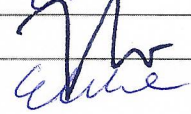
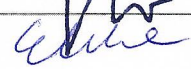
Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, rekrutacja pacjentów, gromadzenie danych klinicznych i wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	
Stanisław Malicki	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	
Florian Veillard	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów, korespondencja z wydawnictwem</i>	
Wojciech Młynarski	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu korespondencja z wydawnictwem</i>	
Milena Greczan	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Barbara Piatosa	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	
Emilia Samborowska	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań</i>	
Janusz Książyk	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Ewa Ehmke vel Emczyńska-Seliga	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Małgorzata Hajdacka	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dariusz Rokicki	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	

4) Neutrophil functions in patients with neutropenia due to glycogen storage disease type 1b treated with empagliflozin.

Kaczor M, Malicki S, Folkert J, Dobosz E, Bryzek D, Chruścicka-Smaga B, Greczan M, Wesół-Kucharska D, Piątosza B, Samborowska E, Madzio J, Książyk J, Ehmke vel Emczyńska- Seliga E, Hajdacka M, Potempa J, Młynarski W, Rokicki D, Veillard F.

Blood Adv. 2024 Mar 26: bloodadvances.2023012403. doi: 10.1182/ bloodadvances. 2023 012403. PMID: 38531056.

Impact factor: 7.5

Autor	Wkład merytoryczny	Podpis
Magdalena Kaczor	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, rekrutacja pacjentów, gromadzenie danych klinicznych i wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	
Stanisław Malicki	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu</i>	
Florian Veillard	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, przegląd piśmiennictwa, opracowanie manuskryptu, odpowiedź na sugestie recenzentów, korespondencja z wydawnictwem</i>	
Wojciech Młynarski	<i>Współpomysłodawca manuskryptu, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu korespondencja z wydawnictwem</i>	
Milena Greczan	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dorota Wesół- Kucharska	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Barbara Piątosza	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań, merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	
Emilia Samborowska	<i>Wykonywanie, analiza i gromadzenie wyników badań</i>	
Janusz Książyk	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Ewa Ehmke vel Emczyńska- Seliga	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Małgorzata Hajdacka	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu</i>	
Dariusz Rokicki	<i>Merytoryczna recenzja manuskryptu, korekta manuskryptu</i>	