

# Spinalna mišićna atrofija

---

**Rajič, Maja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:600856>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Maja Rajič

# **Spinalna mišićna atrofija**

Završni rad

Split, 2024.

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Splitu  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

## SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA

Maja Rajič

SADRŽAJ

Spinalna mišićna atrofija je skupina nasljednih bolesti karakteriziranih propadanjem alfa motoričkih neurona u kralježničnoj moždini. Rad se fokusira na genetsku osnovu bolesti te osobito na ulogu gena SMN1 i SMN2. Razmatraju se različiti tipovi spinalne mišićne atrofije, dijagnostičke metode, komplikacije te različite terapijske opcije. Suvremene terapijske metode uključuju farmakološku terapiju, gensku terapiju i terapiju matičnim stanicama. Posebna pozornost posvećena je lijekovima poput nusinersena i risdiplama te genskoj terapiji koji su značajno promijenili pristup liječenju. Rad naglašava važnost rane dijagnoze i multidisciplinarnog pristupa liječenju kako bi se poboljšala kvaliteta života pacijenata.

**Rad sadrži:** 27 stranica, 1 tablicu, 2 slike; Jezik govornika: hrvatski

**Ključne riječi:** spinalna mišićna atrofija (SMA), gen SMN1, gen SMN2, nusinersen (Spinraza), genska terapija, risdiplam, terapija matičnim stanicama, neuromuskularne bolesti, dijagnostika, farmakološka terapija, protein SMN, multidisciplinarni pristup, molekularna genetika

**Mentor:** prof.dr.sc. Jasna Puizina

**Ocjenjivači:**

prof.dr.sc. Jasna Puizina

izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović

dr. sc. Marija Nazlić

Rad prihvaćen: 09.rujna, 2024. godine

## **SPINAL MUSCULAR ATROPHY (SMA)**

Maja Rajič

### **ABSTRACT**

Spinal muscular atrophy (SMA) is a group of hereditary diseases characterized by the degeneration of alpha motor neurons in the spinal cord. This paper focuses on the genetic basis of the disease, particularly the role of the SMN1 and SMN2 genes. It discusses the different types of spinal muscular atrophy, diagnostic methods, complications, and various therapeutic options. Modern therapeutic approaches include pharmacological therapy, gene therapy, and stem cell therapy. Special attention is given to drugs such as nusinersen and risdiplam, as well as gene therapy, which have significantly changed the approach to treatment. The paper emphasizes the importance of early diagnosis and a multidisciplinary approach to treatment to improve the quality of life for patients.

**The paper contains:** 27 pages, 1 table, 2 images; Speaker's language: Croatian

**Keywords:** Spinal muscular atrophy (SMA), gene SMN1, gene SMN2, nusinersen (Spinraza), gene therapy, risdiplam, stem cell therapy, neuromuscular diseases, diagnostics, pharmacological therapy, SMN protein, multidisciplinary approach, molecular genetics

**Mentor:** prof.dr.sc. Jasna Puizina

**Reviewers :** prof.dr.sc. Jasna Puizina,

izv. prof. dr. sc. Željana Fredotović

dr. sc. Marija Nazlić

Thesis accepted: September 09, 2024.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>1.1 Tipovi spinalne mišićne atrofije</b> .....	2
<b>2. Razrada teme</b> .....	4
<b>2.1 Otkriće gena SMN i njegova uloga u spinalnoj mišićnj atrofiji</b> .....	4
<b>2.2. Struktura proteina SMN</b> .....	5
<b>2.3. Dijagnostika</b> .....	6
<b>2.4 Komplikacije SMA</b> .....	8
<b>2.5 Terapijski pristup</b> .....	11
<b>2.5.1. Farmakološka terapija</b> .....	11
<b>2.5.2. Lijekovi usmjereni prema modulaciji ekspresije gena SMN</b> .....	12
<b>2.5.3. Genska terapija</b> .....	19
<b>2.5.4. Terapija STEM stanicama</b> .....	21
<b>3. Zaključak</b> .....	22
<b>4. Literatura:</b> .....	24

## 1. Uvod

Spinalna mišićna atrofija (SMA) čini skupinu ozbiljnih mišićnih nasljednih bolesti karakteriziranih propadanjem alfa motoričkog neurona kralježničke moždine. Njezina je incidencija oko 1:6000 do 1:11000 živorođenih (D'Amico i sur., 2011). Riječ je o najčešćoj autosomalnoj recesivnoj bolesti koja uglavnom završava smrću u prvim godinama života. Kod djece se najčešće javljaju spinalne mišićne atrofije koje zahvaćaju proksimalne skupine mišića. Do dijagnoze se dolazi molekularno genetičkom analizom. Dijagnostika obuhvaća elektromioneurografiju i analizu bioptata mišića (Barišić i sur., 2013). Bolest je uzrokovana homozigotnom delecijom ili malim mutacijama gena SMN1. Sam protein SMN je ubikvitarno eksprimiran, a ako dođe do njegovog nedostatka dolazi do mišićne slabosti, atrofije te poteškoća u disanju i hranjenju (Lehman, I. 2020). Razlikujemo nekoliko tipova proksimalne SMA; SMA 0, I., II., III. i tip IV (Zerres i sur., 1997).

Cilj ovog rada je ukazati na osnovne karakteristike spinalne mišićne atrofije uključujući uzroke, kliničku manifestaciju, dijagnostiku te različite terapijske pristupe. Razmotrit će se najnovija dostignuća u području istraživanja i liječenja SMA te izazove s kojima se susreću pacijenti, obitelji i medicinski stručnjaci. Ovaj rad će pružiti sveobuhvatan uvid u kompleksnost SMA, s fokusom na napredak u razumijevanju bolesti uključujući i gensku terapiju kojom bi se značajno mogla poboljšati prognoza i kvaliteta života oboljelih osoba.

## 1.1 Tipovi spinalne mišićne atrofije

Degeneracija stanica prednjeg roga kralježnične moždine glavna je značajka svih tipova spinalne mišićne atrofije (SMA). Ova degeneracija uzrokuje postupno slabljenje mišića i njihovu atrofiju (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Klasifikacija spinalne mišićne atrofije (SMA) prvi je put definirana 1991. godine na Međunarodnom konzorciju za SMA, gdje su dogovorene tri glavne skupine temeljene na dobi početka simptoma i ključnim motoričkim postignućima. Klinička klasifikacija zadržala je pristup koji se fokusira na maksimalno ostvareni funkcionalni status, označavajući tip I kao pacijente koji ne sjede, tip II kao sjedeće pacijente i tip III kao hodajuće pacijente (Darras, 2015). Kasnije je klasifikacija proširena na tipove IIIa i IIIb, ovisno o dobi početka simptoma, kako bi se bolje procijenila prognoza (Zerres i sur., 1997). Također, uveden je tip IV za vrlo blagi oblik SMA-e, te tip 0 za pacijente s prenatalnim početkom simptoma i smrću unutar nekoliko mjeseci (Kolb i Kissel, 2015).

SMA 0 je najteži oblik bolesti, a sami simptomi se mogu uočiti već pri rođenju (Barišić i sur., 2013). Ovaj tip se ne smatra indikacijom za liječenje iako postoje izvješća o liječenju u literaturi (Barišić i sur., 2020). Simptomi se javljaju i tijekom trudnoće. Kada se dijete rodi, klasična prezentacija obuhvaća nedostatak disanja i potrebu za umjetnom ventilacijom, a u nekim slučajevima čak i reanimaciju. Generalizirana slabost, hipotonija (slabost mišićnog tonusa), i arefleksija (izostanak refleksa) gotovo su uvijek prisutni, dok su pokreti ograničeni na dlanove i stopala. Fascikulacije jezika često se primjećuju, kao i poteškoće s gutanjem, što u težim slučajevima zahtijeva hranjenje putem nazogastrične sonde. "Bell-shaped chest" (prsni koš oblika zvona), slab plač, te edemi lica, nogu i ruku česti su simptomi. U najtežim slučajevima SMA tipa 0, smrt se događa još u maternici. Autopsija i biopsija otkrivaju gubitak mijeliniziranih vlakana i oštećenje aksona u senzoričkim i miješanim vlaknima. Smrt nastupa nakon 6 mjeseci uglavnom zbog respiratorne dekompenzacije uzrokovane infekcijom ili aspiracijom. Smrt se događa nakon nekoliko sati nakon isključenja aparata (Thomas i Dubowitz, 1994; Macleod i sur., 1999).

Najčešći oblik je SMA 1 ili i Werdnig-Hoffmanova bolest. Simptomi mogu biti prisutni već i unutar maternično te se očitovati oskudnim pokretima fetusa. Dob preživljavanja je obično do 2. godine života. Ta se dob danas produljuje zahvaljujući napretku u suportivnoj njezi i napretku liječenja. Oko 32% bolesnika preživi do 2. godine, 18% do 4. godine, a 8 do 10% do 10. godine.

Zahvaljujući širokoj primjeni neinvazivne ventilacije, rizik smrtnog ishoda u ranom djetinjstvu se smanjuje od 1995. godine. Glavni simptomi SMA 1 uključuju hipotoniju ili slabost mišića što rezultira nemogućnošću samostalnog sjedenja. Kod oboljelih dolazi i do paralize interkostalnih mišića uz relativno netaknutu dijafragmu. Prisutne su i fascikulacije jezika, otežano sisanje i gutanje te dolazi do povećane učestalosti aspiracija što dovodi do čestih pneumonija (Barišić i sur., 2013).

SMA II predstavlja intermedijarni oblik spinalne mišićne atrofije koji se obično javlja nakon trećeg mjeseca života. Takva djeca mogu samostalno sjediti, a neka čak i stajati pomoću odgovarajuće podrške (Barišić i sur., 2013). Karakteriziraju ih progresivna slabost, posebno u nogama, te hipotonija (smanjen mišićni tonus) i arefleksija (izostanak refleksa). Razvijaju skoliozu, koja se s vremenom pogoršava zajedno sa slabostima interkostalnih mišića i dovodi do razvoja restriktivne bolesti pluća (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Djeca oboljela od SMA II imaju veću funkcionalnu sposobnost u usporedbi s onima koji boluju od SMA I. Javlja se poteškoće u gutanju i govoru te respiratorna insuficijencija što znači nedostatak sposobnosti disanja. (Barišić i sur., 2013). Preživljavanje kod ovog oblika bolesti iznosi oko 97,8% do desete godine života, a otprilike 68,5% do dvadeset i pete godine (Zerres i sur., 1997.). Uglavnom imaju 3 kopije gena SMN2 (Kolb i Kissel, 2015).

SMA III, poznata i kao Wohlfart-Kugelberg-Welanderova bolest, predstavlja klinički heterogeniji oblik spinalne mišićne atrofije. Dijeli se na dva podtipa: IIIa (nastup simptoma prije 3. godine života) i tip IIIb (nastup simptoma nakon 3. godine života) koji se temelje na statističkoj vjerojatnosti da osoba bude pokretna i nakon određenog trajanja bolesti. Za tip IIIa ta vjerojatnost iznosi 22%, a za tip IIIb 58,7% nakon 40. godine života. Oboljeli imaju progresivnu slabost koja zahvaća više noge nego ruke te ne razvijaju slabost respiratornih mišića ili skoliozu, a mogu imati i tremor. (Zerres i sur., 1997; Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Obično se manifestira kada dijete počne hodati, što se obično događa nakon 18 mjeseci života. Karakteristično je za SMA tip III da djeca mogu dosegnuti sve stupnjeve motoričkog razvoja, ali s kasnijom progresijom bolesti te se često se javlja potreba za korištenjem invalidskih kolica. Postoji mogućnost razvoja skolioze te znakova artropatije (promjene na zglobovima uzrokovane hipotonijom mišića i povećanim opterećenjem) (Barišić i sur., 2013). Prosječan broj kopija gena SMN2 iznosi 3 ili 4 (Kolb i Kissel, 2015).



SMA IV je adultni oblik koji se manifestira u drugom desetljeću i karakterizira ga blago progresivni tijek (Barišić i sur., 2013). Prosječan broj kopija gena SMN2 iznosi 4 do 8 (Kolb i Kissel, 2015).

## **2. Razrada teme**

### **2.1 Otkriće gena SMN i njegova uloga u spinalnoj mišićnj atrofiji**

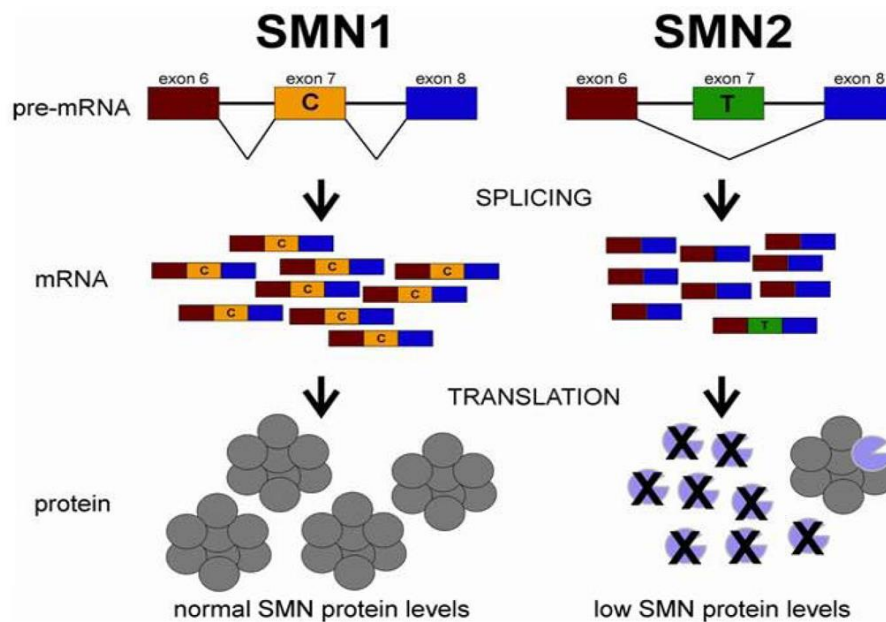
Istraživanje genetike spinalne mišićne atrofije započinje 1990. godine kada je identificiran lokus 5q13 kao potencijalni genetički uzrok ove bolesti. Nakon pet godina istraživanja, konačno je otkriven gen SMN (eng. survival motor gene). U ljudskom genomu postoji više njegovih kopija. Dva gotovo identična gena SMN prisutna su na kromosomu 5q13: telomerni ili gen SMN1, koji je gen za određivanje spinalne mišićne atrofije i centromerni ili gen SMN2 (D'Amico i sur., 2011). Obično jedan kromosom nosi kopiju gena SMN1, smještenu na telomernom dijelu kromosoma, na lokusu 5q13. U odnosu na njega, jedna ili više kopija gena SMN2 razlikuju se od SMN1 samo u pet baznih parova. Gen SMN2 postoji jedino kod ljudi. SMN1 i SMN2 sastoje se od devet egzona i osam introna. 98% bolesnika ima homozigotnu deleciju, reorganizacije ili točkaste mutacije gena SMN1. Kod svih bolesnika postoji barem jedna kopija gena SMN2 koji prolazi drugačijim putem transkripcije što se naziva alternativnom doradom (engl. splicing). Većina transkripata SMN2 ne sadrži egzon 7 ili egzon 5, a moguće i oba egzona koji su prisutni u mRNA u genu SMN1. Postoje negativni ili pozitivni regulatori splicinga, odnosno oni koji se vežu na premRNA sekvencu i uzrokuju smanjeno ili pojačano spajanje egzona i introna. SMN $\Delta$ 7 je naziv za protein (s obzirom na izostanak egzona 7) koji nastaje translacijom alternativne mRNA te nije funkcionalan i brzo se razgrađuje. Ipak, oko desetine premRNA izrezuje se u funkcionalni protein SMN. Postoji mogućnost i da se se gen SMN2 "ispravno" translira u protein SMN1 (a ne u SMN7) i u većoj mjeri. SMN je eksprimiran u jezgri i citoplazmi svih somatskih stanica s najvećom koncentracijom u alfa motoričkim neuronima. Njegova uloga nije u potpunosti razjašnjena, ali sudjeluje u obradi mRNA te je važan u rekombinaciji i transkripciji DNA, vezikularnom transportu i transdukciji signala. SMN je značajan za aksonski transport te razvoj neurona i neurita (D'Amico i sur., 2011). Nedostatak ovog proteina će uzrokovati degeneraciju neurona, osobito prednjeg roga kralježnične moždine i kromatolizu u preostalim neuronima što dovodi do gubitka strukture neurona. Dolazi do nastajanja grubog citoretikuluma i pomaka jezgre prema periferiji. Kromatoliza se javlja prije

neuronske regeneracije i degeneracije i na granici je neuronske smrti. Smatra se da SMN ima ulogu i u središnjem živčanom sustavu kao i u jetri, gušterači, krvnim žilama, srcu, mišiću te drugim organskim sustavima. Tijekom fetalnog i embrionalnog razvoja razina SMN-a je dosta visoka što se smanjuje 2 tjedna postnatalno. (Barišić i sur., 2020).

## 2.2. Struktura proteina SMN

Protein SMN je prisutan u jezgri i citoplazmi svih stanica (Burghes i Beattie, 2009; Nash i sur., 2016; Singh i sur., 2017). Njegova molekulska masa iznosi 38 kD te se sastoji od 294 aminokiselinskih ostataka. Ti ostaci su podijeljeni u nekoliko domena: N-terminalna, GEMIN2 (eng. gem-associated protein 2) i domena koja veže nukleinske kiseline, središnja Tudor domena, te C-terminalna, prolinom bogata i YG domena. Sve mutacije u tim domenama povezane su sa SMA, što ukazuje na to da je integralna struktura proteina ključna za njegovu funkciju (Singh i sur., 2017).

Konzerviranost aminokiselinske sekvence proteina SMN među višim kralježnjacima je visoka. Tri konzervirana segmenta od po pedesetak aminokiselinskih ostataka nalaze se na N-terminusu, središnjoj regiji i C-terminusu. Sve te regije imaju interakcijske partnere. Domena za vezanje nukleinskih kiselina je konzervirana i preklapa se s veznim mjestom za protein GEMIN2. Upravo taj kompleks SMN-GEMIN2 ima ključnu ulogu u funkciji proteina, uključujući sastavljanje malih nuklearnih ribonukleoproteina (snRNP), DNA rekombinaciju, sintezu čestice za prepoznavanje signala (SRP) i regulaciju translacije. Tudor domena slijedi egzonski kodiranu domenu 2 koja stupa u interakciju s proteinom p53, važnim za stanični ciklus i supresiju tumora. Iza tudor domene slijedi prolinom bogata domena koja stupa u interakciju s profilinima, proteinima koji kontroliraju dinamiku aktina u stanicama. YG domena i zadnjih 16 aminokiselina iz egzona 7 su važne za samoudruživanje, što je ključno za stabilnost i subcelularnu lokalizaciju proteina (Singh i sur., 2017). Protein koji nastaje translacijom transkripta SMN $\Delta$ 7 nema sposobnost oligomerizacije (Lorson, 1998; Lorson i sur., 1999; Burnett i sur., 2009).



Slika 1. Struktura gena i proteina SMN1 i SMN2 (preuzeto iz *Burghes i Beattie, 2009*)

Geni SMN1 i SMN2 imaju istu strukturu i 99,9% su identični na razini sekvenci. Ključna razlika između njih je jedna nukleotidna promjena u egzonu 7 (C ili T). Ta razlika utječe na posttranskripcijsku doradu gena, tako da većina gena SMN2 nema funkcionalnih transkripata, dok većina transkripata gena SMN1 sadrži egzon 7. Ipak, budući da SMN2 proizvodi određenu količinu cjelovitog proteina SMN, može se smatrati genom sa smanjenom funkcijom, a ne potpunim gubitkom funkcije. Izostanak aminokiselina koje kodira egzon 7 dovodi do formiranja proteina SMN sa znatno smanjenom učinkovitošću oligomerizacije i stabilnosti. Zbog toga, gubitak gena SMN1 rezultira smanjenim razinama proteina SMN u većini tkiva. SMN oligomer prikazan je kao octamer (Slika 1).

### 2.3. Dijagnostika

Kod bolesnika koji pokazuju kliničke znakove spinalne mišićne atrofije prvi korak je genetička analiza kako bi se otkrila homozigotna delecija gena SMN1. U slučaju da se delecija ne otkrije moraju se isključiti druge bolesti poput neuropatije, amiotrofičke lateralne skeroze (ALS) te druge bolesti motoneurona. U slučaju da se te bolesti ne potvrde, onda se sekvencioniraju obje kopije gena SMN1 očekujući homozigotne točkaste mutacije (Barišić i sur., 2013). Ukoliko je prisutna

samo jedna cjelovita kopija gena SMN1, a klinički fenotip sugerira SMA, potrebno je napraviti sekvencijsku analizu SMN1 kako bi se identificirale moguće mutacije (Mercuri i sur.,2018).

U gotovo 96% slučajeva, spinalna mišićna atrofija (SMA) uzrokovana je homozigotnom delecijom egzona 7 i 8 ili egzona 7 gena SMN1. U 3% do 4% slučajeva, prisutne su druge vrste mutacija, kao što su točkaste mutacije missense ili nonsense ili mutacije s pomakom okvira čitanja, obično na jednom alelu, dok je drugi alel obično pogođen delecijom. Većina tih mutacija naslijeđena je od roditelja, dok se *de novo* mutacije javljaju u oko 2% slučajeva. Postavljanje dijagnoze temelji se na molekularno-genetičkom testiranju i to je glavna metoda. U tipovima 1 i 2 najčešće nema potrebe za biopsijom mišića te čak ni za elektromioneurografijom (EMG). Najčešće metode koje se upotrebljavaju kod molekularno genetičkog dijagnosticiranja su MLPA (od engl. multiplex ligation probe amplification), real-time PCR (od engl. polymerase chain reaction) i RFLP PCR (od engl. restriction fragment length polymorphism) (Lehman, I. 2020). Homozigotne delecije gena SMN1 mogu se otkriti pomoću običnog PCR-a nakon obrade restrikcijским enzimima. Ta metoda je brža, ekonomičnija i široko dostupna, ali ne omogućuje određivanje broja kopija gena. Kvantitativna analiza SMN1 bitna je za otkrivanje heterozigotnih delecija, dok je broj kopija SMN2 ključan prognostički faktor (Mercuri i sur., 2018).

Kod ubacivanja višestrukih kopija humanog gena SMN2 u miša sa homozigotnom delecijom mišjeg gena SMN sprječava se ekspresija bolesti. Analizom genoma bolesnika, utvrđeno je da je ozbiljnost bolesti obrnuto proporcionalna s brojem kopija gena SMN2 što ga čini biomarkerom težine bolesti (Barišić i sur., 2013). Navedenim metodama (osim RFLP PCR-a) može se utvrditi broj kopija gena SMN 2. Broj kopija gena SMN 2 nije ključan za postavljanje dijagnoze, ali se preporuča odrediti u svim slučajevima s obzirom na njegovu ulogu u težini prezentacije kliničke slike (Lehman, I. 2020).

Bolesnici s tipom 1 SMA-e imaju obično dvije kopije gena SMN2, dok tip 2 može imati dvije ili tri kopije, a tip 3 obično tri ili više. Bolesnici s pet ili više kopija gena SMN2 mogu biti asimptomatski, ali imaju 50% šanse da budu nositelji mutacije. Međutim, katkada težina kliničke slike i nije u skladu s brojem kopija gena SMN2 (Lehman, I. 2020). Ako se broj kopija gena SMN2 koristi za predviđanje prognoze, važno je prilikom savjetovanja oboljelih i njihovih obitelji napomenuti da ta korelacija nije uvijek precizna, te da neki pacijenti mogu imati drugačiji ishod

od onoga koji je predviđen na temelju broja kopija gena SMN2 (Mercuri i sur., 2018). Ova istraživanja su također otkrila da se razina RNA plastina 3 značajno razlikuje kod bolesnika s različitim fenotipovima SMA-e, što može biti povezano s težinom bolesti i spolom. Sve te spoznaje naglašavaju složenost genetskih faktora koji utječu na kliničku prezentaciju SMA-e te sugeriraju da postoje dodatni čimbenici koji utječu na ovu povezanost između genotipa i fenotipa (Barišić i sur., 2013).

Testiranje nositelja bolesti je dostupno, a učestalost nositelja varira od 1/42 do 1/72, ovisno o populaciji koja se testira. Analiza broja kopija gena SMN1 može identificirati 95% nositelja. Također, moguće je provesti prenatalni probir putem biopsije korionskih resica ili analizom DNA dobivene amniocentezom (Arnold i sur., 2015).

Rana pojava slabosti i denervacije karakteristična je za SMA, ali i za druge nasljedne poremećaje motoričkih neurona koji nisu povezani sa genom SMN. Takvi poremećaji se manifestiraju različitim kliničkim simptomima (Zerres i Davies, 1999). Atipični simptomi uključuju kontrakture zglobova, veću slabost u distalnim nego u proksimalnim mišićima, paralizu dijafragme s ranim respiratornim zatajenjem i pontocerebelarnu degeneraciju. Za neke od tih poremećaja dostupno je DNA testiranje, ali ne za sve (Wang i sur., 2007).

## **2.4 Komplikacije SMA**

Komplikacije koje proizlaze iz neuromuskularne slabosti mogu utjecati na više organskih sustava, uključujući respiratorni sustav zbog restriktivne bolesti pluća, gastrointestinalni sustav s pojavom disfagije i konstipacije, te mišićno-koštani sustav kroz progresivne deformacije (Iannaccone, 2007). Rješavanje tih komplikacija je od izuzetne važnosti, a pacijenti i njihove obitelji značajno profitiraju od multidisciplinarnog pristupa njezi koji uključuje stručnjake iz neurologije, ortopedije, fizikalne terapije, pulmologije, nutricionizma i gastroenterologije (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015; Mercuri i sur., 2018).

Skolioza je vrlo česta kod djece s SMA tipa I i II, s učestalošću od 60 do 90%, često se pojavljujući u ranom djetinjstvu. Kod teže oboljelih pacijenata, zbog kraćeg životnog vijeka, spinalne komplikacije nisu bile prioritet. Međutim, s razvojem novih terapija i produljenjem životnog vijeka, liječenje spinalnih problema postaje sve važnije (Mercuri i sur., 2018). Redoviti pregledi kralježnice preporučuju se najmanje svakih šest mjeseci. Primjena spinalnih ortoza preporučena je

za podršku hipotoničnom trupu, usporavanje progresije spinalne deformacije i poboljšanje respiratorne funkcije. Iako ne postoji konsenzus o vrsti ortoza koje treba koristiti, ortoze ne mogu zaustaviti progresiju skolioze (Arnold i sur., 2015; Mercuri i sur., 2018). Kontrakture su česta pojava kod nepokretnih pacijenata sa SMA. Redovite vježbe istezanja i korištenje ortoza važni su za održavanje fleksibilnosti i prevenciju zglobnih kontraktura (Wang i sur., 2004; Fujak i sur., 2011). Često se javlja i nestabilnost kuka koja ne uzrokuje bol, a kirurški zahvat je indiciran samo u slučaju intenzivne boli (Mercuri i sur., 2018). Prijelomi su česti kod oboljelih, često zbog osteoporoze, smanjenih razina vitamina D i ograničene pokretljivosti (Mercuri i sur., 2018). Također, postoje dokazi da niske razine SMN proteina direktno utječu na smanjenje gustoće kostiju stimulacijom receptora RANK (Nash i sur., 2016).

Javljaju se i komplikacije probavnog sustava koje uključuju poteškoće hranjenja, disfagiju, gastroezofagealni refluks, usporeno gastrično pražnjenje i konstipaciju (Arnold i sur., 2015; Kolb i Kissel, 2015). Nedavni dokazi ukazuju na moguće metaboličke promjene kod pacijenata s SMA kao što je metabolička acidoza, poremećaji metabolizma masnih kiselina te promjene u razinama lipida i glukoze (Mercuri i sur., 2018). Slabost mišića, teškoće u gutanju i respiratorni problemi dovode do smanjenog unosa hrane i često rezultiraju malnutricijom (Arnold i sur., 2015; Mercuri i sur., 2018). Oboljelima se može postaviti nazogastrična ili nazojejunalna sonda, a kao dugotrajno rješenje se koristi gastrosoma. Važno je izbjegavati razdoblja gladovanja jer mogu ubrzati gubitak mišićne mase (Arnold i sur., 2015). Osobe s teškim oblikom bolesti, koje su manje fizički aktivne, često su pod povećanim rizikom od pretilosti (Mercuri i sur., 2018). Pacijenti s tipom III SMA rijetko pokazuju poremećaje poput disfagije i poteškoća s hranjenjem. Unatoč tome, preporučuje se nutricionistička/dijetetička procjena. Glavni problem u toj skupini oboljelih često je pretilost (Mercuri i sur., 2018).

Respiratorne komplikacije su glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod oboljelih od SMA tipa I i II, kao i kod manjeg broja oboljelih od tipa III. Respiratorni problemi uključuju slab kašalj s otežanim uklanjanjem sekreta iz donjih dišnih puteva, nokturnu hipoventilaciju, neadekvatan razvoj prsnog koša i pluća te učestale infekcije (Wang i sur., 2007). Slab kašalj predstavlja problem zbog rizika od ponovljenih infekcija, aspiracije i hipoksemije uzrokovane zadržavanjem sekreta (D'Amico i sur., 2011; Kolb i Kissel, 2015). Poteškoće s gutanjem i refluksom također su važni faktori koji doprinose morbiditetu (D'Amico i sur., 2011). Restriktivna plućna bolest je najvažnija

komplikacija SMA, a kod težih oblika bolesti pogoršana je i razvojem skolioze (Iannaccone, 2007). Sva djeca sa SMA tipa I te otprilike trećina sa SMA tipa II razvijaju respiratornu insuficijenciju ili zatajenje tijekom djetinjstva (Arnold i sur., 2015).

U posljednjem desetljeću došlo je do značajnog pomaka u pristupu liječenju respiratornih komplikacija prelazeći s reaktivnog na proaktivni pristup. Respiratorna fizioterapija zajedno s mehaničkom insuflacijom-eksuflacijom (primjerice, Cough Assist™ ili VitalCough™) trebala bi biti glavna metoda za čišćenje dišnih putova kod SMA tipa I i II. Te tehnike treba uvoditi proaktivno, temeljem procjene učinkovitosti kašlja ili vršnog protoka zraka pri kašlju (peak cough flow). Oralna sukcija sekreta pomoću mehaničke pumpe i katetera ključna je za pacijente s neučinkovitim kašljem, dok pacijente s visokim rizikom od stvaranja mukoznog čepa treba noću nadzirati pulsним oksimetrom (Kolb i Kissel, 2015).

Neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom (NIV; dvorazinska tlačna potpora ventilaciji) preporučuje se za sve simptomatske bolesnike. U slučaju težih oblika bolesti, NIV treba započeti prije pojave simptoma respiratornog zatajenja, jer rana primjena povećava preživljenje i poboljšava kvalitetu života (Kolb i Kissel, 2015; Finkel i sur., 2018). Kontinuirana neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom (CPAP) ne bi se trebala koristiti osim u specifičnim slučajevima, poput mlađih pacijenata bez izražene hiperkapnije ili onih koji ne mogu pravilno koristiti NIV. Kada se NIV primjeni s odgovarajućim postavkama, dobro se podnosi, ne narušava hemodinamsku ravnotežu, poboljšava kemoosjetljivost i smanjuje dnevnu hiperkapniju (Kolb i Kissel, 2015). Invazivna ventilacija treba se primijeniti samo kada neinvazivna ventilacija (NIV) nije dovoljno djelotvorna. Odluka o prelasku na invazivnu ventilaciju mora biti temeljena na kliničkom stanju pacijenta i prognozi, te donesena u suradnji s pacijentom (ako je prikladne dobi) i njegovom obitelji (Finkel i sur., 2018).

Nebulizirani bronhodilatatori trebaju biti dostupni u slučaju sumnje na astmu. Dugotrajna primjena nebuliziranih hipertoničnih otopina za razrjeđivanje sekreta nije preporučena jer ne postoje dokazi koji bi podržali njihovu učinkovitost. Osim toga, ove otopine mogu razrijediti sluz normalne viskoznosti, što može dodatno opteretiti pacijenta. Za liječenje hipersalivacije može se koristiti glikopirolat, uz pažljivo prilagođavanje doze kako bi se spriječilo isušivanje sekreta i stvaranje mukoznih čepova. Injekcije botulinum toksina tipa A u žlijezde slinovnice, koje smanjuju

produkciju oralnog sekreta nisu preporučene. Kod težih oblika SMA, palivizumab bi se trebao koristiti tijekom sezone respiratornog sincicijskog virusa (Finkel i sur., 2018).

## 2.5 Terapijski pristup

Ne postoji lijek za potpuno izlječenje spinalne mišićne atrofije, a i sama patogeneza poremećaja nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, u posljednjih par godina postignut je napredak u razumijevanju molekularne osnove bolesti te se razvijaju različiti terapijski pristupi (Lehman, I. 2020). Terapijski pristup se temelji na nekoliko mehanizama: neuroprotekcija, povećanje mišićne mase i snage, povećanje transkripcije gena SMN2 u SMN protein te terapija matičnim stanicama. Neuroprotekcija podrazumijeva uključivanje egzona 7 u transkripte mRNA gena SMN2, aktivaciju promotora transkripcije SMN2 te sprečavanje degradacije proteina SMN. (Barišić i sur., 2013)

### 2.5.1. Farmakološka terapija

Različiti mehanizmi su ciljani kliničkim ispitivanjima spinalne mišićne atrofije, poput neuroprotektivnih lijekova za spašavanje motoneurona (kao što je riluzol), kreatina za poboljšanje energetskog metabolizma te arbuterola zbog njegovih anaboličkih svojstava i molekularnog učinka na ekspresiju gena SMN2 (D'Amico i sur., 2011).

**Albuterol** potiče uključivanje egzona 7 u SMN2 transkripte i djeluje kao stimulator gena SMN2, dovodi do povećanja mišićne snage i mase te poboljšanja plućne funkcije. Postoje osnovni molekularni mehanizmi koji dovode do povećanja transkripcije gena SMN2 u protein SMN, a oni uključuju: uključivanje egzona 7 u SMN2 mRNA transkripte, aktivaciju promotora transkripcije gena SMN2, modulaciju translacije proteina SMN, kao i sprječavanje degradacije proteina SMN. (Barišić i sur., 2013)

**Aklarubicin** je citostatik iz tetraciklinske skupine koji je pokazao sposobnost povećanja uključivanja egzona 7 u mRNA gena SMN2. Međutim, zbog svoje toksičnosti nije prihvatljiv za kliničku primjenu. Natrij butirrat djeluje na acetilaciju histonskih proteina što rezultira povećanom ekspresijom gena SMN2 i uključivanjem egzona 7. Zbog kratkog poluvijeka u ljudskoj plazmi nije praktično primjenjiv. Epigenetički modifikatori povećavaju ekspresiju gena SMN *in vivo* i *in vitro*,



potičući acetilaciju histona i remodeliranje kromatina oko promotorske regije gena SMN. Istraživanja su pokazala da spojevi koji djeluju kao inhibitori deacetilacije histona, poput hidroksiureje mogu imati sličan učinak, posebno u slučaju SMA tipa I. Valproična kiselina, poznata kao antiepileptik, također djeluje na sličan način kao natrij butirat, a osim toga, smanjuje degeneraciju motornih neurona, atrofiju mišića i motoričku disfunkciju kod miševa sa SMA (Barišić i sur., 2013).

Jedan od neuroprotektivnih spojeva koji je pokazao značajan potencijal u prekliničkim ispitivanjima je **olesoksim**, oralno aktivni stabilizator membrane mitohondrija. Ta ispitivanja su pokazala smanjenje fluidnosti membrane mitohondrija, mišićne denervacije, astroglioze, mikroglijalne aktivacije te smanjenje gubitka motoričkih neurona (Sunyach i sur., 2012). Međutim, nakon provedene dvostruko-slijepa, placebo kontrolirane studije faze II na bolesnicima sa SMA tipom II ili nepokretnim sa SMA tipom III, razvoj lijeka je obustavljen zbog razočaravajućih rezultata kliničkog ispitivanja. (Weber i sur., 2019).

**Reldesemtiv** je aktivator troponina u brzim vlaknima skeletnih mišića. Djeluje tako da usporava oslobađanje kalcija iz kompleksa s troponinom. Ovaj sporiji proces oslobađanja kalcija osjetljiv je na sarkomere, što rezultira pojačanom kontrakcijom mišića (Hwee i sur., 2015).

## **2.5.2. Lijekovi usmjereni prema modulaciji ekspresije gena SMN**

Kod većine neurodegenerativnih bolesti, terapija je simptomatska ili suportivna. Ta činjenica je sve donedavno vrijedila i za spinalnu mišićnu atrofiju. Cilj etiološke/selektivne terapije je zaustaviti progresiju bolesti, produljiti životni vijek te potpuno izlječiti samu bolest. Dugotrajne posljedice same terapije nisu poznate s obzirom da nema dovoljno publikacija o njihovom uspjehu. Značajan napredak genske terapije se postiže ako se s njom krene rano što vrijedi osobito za SMA tipa 1 (Barišić i sur., 2020). Kako je ekspresija proteina SMN prisutna u cijelom tijelu, SMA može zahvatiti periferno tkivo uz motorne neurone. Multidisciplinarni pristup liječenju, koji uključuje, ali nije ograničen, na pulmološku, nutritivnu i ortopedsku skrb u kombinaciji s terapijama koje modificiraju tijek bolesti pokazuje najbolje rezultate. Tri terapije koje ciljaju na SMN-deficijenciju kod SMA, poznate kao SMN regulatorni ili korektivni tretmani, odobrene su od strane FDA i

dobile su dozvolu za stavljanje na tržište u Europskoj uniji, a to su: Spinraza, Risidiplam i Zolgensma (Barišić i sur., 2020).

## **Nusinersen/Spinraza**

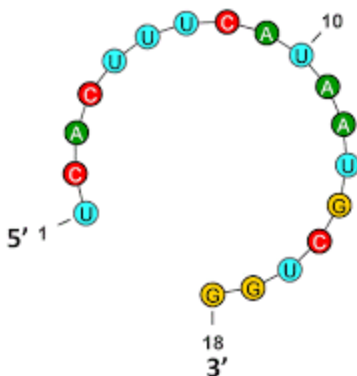
Nedavna istraživanja pokazuju da protein SMN može imati važnu ulogu i u organima i perifernim tkivima, ne samo u središnjem živčanom sustavu (Day i sur., 2022).

Jedan od lijekova koji sudjeluje u modifikaciji napretka SMA jest protusmisleni oligonukleotid spinraza/nusinersen, ali taj lijek ne dovodi do izlječenja (Barišić i sur., 2020).

Protusmisleni oligonukleotidi se koriste u tehnici poznatoj kao terapija “engl. splice-switching”. Dizajniraju se kako bi se komplementarno sparili s određenim dijelovima prekursorne molekule RNA i na taj način promijenili kako se ta molekula obrađuje, odnosno izrezuje introne i povezuje egzone (Bennett i sur., 2019). Pobudili su veliko zanimanje kod liječenja spinalne mišićne atrofije kao i drugih neuromuskularnih bolesti, jer uključuju egzon 7 u SMN2 mRNA, popravljaju defekt RNA, aktiviraju promotora transkripcije SMN2, sprečavaju degradaciju i povećavaju količinu proteina SMN što dovodi do stvaranja stabilnog i funkcionalnog proteina te prelaze krvno-moždanu barijeru. ASO-I su omogućili normalizaciju fenotipa na eksperimentalnim modelima. Nusinersen/Spinraza je u Hrvatskoj odobren 2017. godine (Barišić i sur., 2013). Budući da lijek nusinersen ne može u dovoljnoj mjeri proći kroz krvno-moždanu barijeru, mora se primjenjivati intratekalno, što značajno ograničava njegovu sposobnost djelovanja izvan središnjeg živčanog sustava (Day i sur., 2022).

Ovaj lijek se vezuje na supresor prekrajanja i omogućuje produkciju oko 90% funkcionalnog proteina. Njegova veličina je 18 nukleotida (slika 2.) i povećava razinu SMN-a 2-6 puta. Kod prirodnog tijeka bolesti umire oko 80% bolesnika već u drugoj godini života. Međutim, spinraza omogućuje preživljavanje kod čak 60% oboljelih. U kliničkom ispitivanju liječenja spinrazom zabilježeno je 16% smrtnih slučajeva, a kod 23% djece je bila potrebna mehanička ventilacija. U ENDEAR studiji je potvrđena učinkovitost spinraze gdje su obuhvatili 121 dijete od kojih je 80 bilo liječeno spinrazom. Oboljeli koji su ranije započeli s terapijom (prije dobi od 13,4 tjedna) rezultirala je boljim ishodom bolesti, bez potrebe za mehaničkom ventilacijom kod 77% ispitanika u usporedbi s njih 31% koji su terapiju započeli u dobi starijoj od 13,4 tjedna. Bolje motoričke funkcije su uočene kod 93% pacijenata koji su ranije započeli s terapijom. Također, 60% mlađih

pacijenata usvojilo je sposobnost samostalnog sjedenja nakon osam mjeseci terapije, u usporedbi s 31% starijih pacijenata (Barišić i sur., 2020). Uočeno poboljšanje motorike je zabilježeno kod 40% bolesnika koji su liječeni spinrazom od kojih je 8% moglo samostalno sjediti, a 1% i stajati. Kod bolesnika liječenih placeboom je došlo do pogoršanja motoričkih sposobnosti. Uočeno je da kod liječenja nusinersenom se javlja poboljšanje u motoričkoj aktivnosti mišića udova, ali se povoljan učinak ne javlja kod dišnog i probavnog sustava. 6% bolesnika je imalo učinjenu traheostomu tijekom liječenja. Bolesnici s poremećajem gutanja se nisu oporavili te su ostali ovisni o sondi. Spinraza je produljila život oboljelima na mehaničkoj ventilaciji i poboljšala motoriku, ali nije utjecala na dišni sustav.



Slika 2. Nukleotidni slijed spinraze (Izvor: PubChem; SID: [328083518](#), CID: 124037382)

Sam uspjeh liječenja ovisi o dobi bolesnika u trenutku primjene terapije, trajanju bolesti prije same primjene te o broju kopija SMN2 (Barišić i sur., 2020).

Na važnost presimptomaskog liječenja ukazuje i činjenica da preimptomatski bolesnici koji su liječeni nusinersenom prije šest tjedana života sjede samostalno nakon 12-34 mjeseca (100%) te hodaju uz pomoć (88%) ili samostalno (77%) u dobi od 18 mjeseci. Važno je naglasiti da se potpuni oporavak ne očekuje. Još uvijek nema značajnih kriterija kojima se određuje uključivanje oboljelih s različitim tipovima SMA u liječenje Spinrazom niti kriterija za isključivanje liječenja. Sva dosadašnja istraživanja su provedena kod djece s tipom I, II, III u dobi do 15 godina. Kod starijih bolesnika je zaključeno da se nusinersenom zaustavlja progresija bolesti i poboljšavaju motoričke sposobnosti, ali su potrebna daljnje publikacije na tu temu (Barišić i sur., 2020).

Nusinersen je vrlo skup lijek koji se koristi i za liječenje drugih neuromuskularnih bolesti te bi svi oboljeli trebali imati pristup lijeku (Barišić i sur., 2020).

### ***Nuspojave***

Najčešće nuspojave intratekalne primjene nusinersena uključuju respiratorne infekcije i zatvor. U sažetku opisa svojstava lijeka ističe se povećan rizik od trombocitopenije, problema s koagulacijom i bubrežne toksičnosti, što treba ozbiljno shvatiti. Osobe s trombocitopenijom i bubrežnom disfunkcijom bile su isključene iz kliničkih ispitivanja. Nadalje, zabilježen je pad trombocita kod nekih pacijenata ispod normalnih vrijednosti. Zbog toga se preporučuju laboratorijske analize trombocita, protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena i kvantitativna analiza proteina u urinu na početku liječenja i prije svake naredne doze lijeka (Shen i Corey, 2017; Claborn i sur., 2018; Neil i Bisaccia, 2019).

Nuspojave kao što su glavobolja, bolovi u leđima i povraćanje povezane su s lumbalnom punkcijom i mogu biti manifestacije postpunkcijskog sindroma. Također, zabilježeni su slučajevi neopstruktivnog hidrocefalusa koji nisu bili povezani s meningitisom ili krvarenjem.

### ***Primjena nusinersena u Hrvatskoj***

U Hrvatskoj se praćenje pacijenata koji boluju od spinalne mišićne atrofije (SMA) tipa I do III provodi putem nacionalnog registra koji je integriran u međunarodni registar TREAT NMD (Translational Research Europe: assessment and treatment of rare inherited neuromuscular disease) od 2012. godine (Barišić i sur., 2020) (Tablica 1).

TABLICA 1. Podatci iz Hrvatskog registra pedijatrijskih bolesnika sa SMA-om

Demografske karakteristike bolesnika sa SMA-om I. dijagnoza		
Broj bolesnika		42
	SMA I	17
	SMA II	16
	SMA III	9
Dob početka kliničkih znakova	SMA I	2,35 mj (1mj - 5mj)
	SMA II	10,68 mj (3 mj - 4god)
	SMA III	3,2 god (2 mj - 10 god)
Dob postavljanja dijagnoze	SMA I	3,6 mj (1 mj - 7 mj)
	SMA II	17,7 mj (11 mj - 3.5 god)
	SMA III	5,9 god (3 mj - 14 god)

*Tablica 1. (Barišić i sur., 2020)*

Međunarodni registar TREAT NMD je mreža izvrsnosti koja se fokusira na neuromuskularne bolesti. Njegovi ciljevi uključuju osiguravanje jednakog pristupa liječenju za sve pacijente s neuromuskularnim bolestima diljem svijeta, olakšavanje njihovog uključivanja u klinička ispitivanja te poticanje istraživanja novih terapijskih pristupa. Nacionalni registri igraju ključnu ulogu u praćenju pacijenata sa spinalnom mišićnom atrofijom (SMA) pružajući važne podatke za istraživanje i organizaciju terapijskih intervencija. Primjerice, organizacija i primjena terapije nusinersenom temeljila se na podacima Nacionalnog registra, što je omogućilo odabir pacijenata i objektivnu procjenu njihovog kliničkog stanja (Barišić i sur., 2020).

Prema istraživanju provedenom na pacijentima sa spinalnom mišićnom atrofijom (SMA) tipa I u Hrvatskoj, primijenjena terapija rezultirala je značajnim poboljšanjem na CHOP INTEND ljestvici (Barišić i sur., 2020). CHOP INTEND ljestvica (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) je klinička skala koja se koristi za procjenu motoričkih funkcija kod dojenčadi i male djece s neuromuskularnim poremećajima, uključujući spinalnu mišićnu atrofiju (SMA). Ova ljestvica ocjenjuje različite aspekte motoričkih funkcija poput podizanja glave, ležanja na trbuhu, podizanja nogu, hvatanja, i slično (Finkel i sur., 2016).

Prije terapije, pacijenti su imali raspon od 5 do 12 bodova, dok su nakon šest mjeseci dosegli 11 do 31 bod, a nakon godinu dana 28 do 37 bodova (Barišić i sur., 2020).

Kod pacijenata sa SMA tipa III, ocjena prema HFMSE ljestvici prije terapije iznosila je između 45 i 61 boda, dok je nakon šest mjeseci porastao na 48 do 62, a nakon godinu dana na 49 do 63 bodova (Barišić i sur., 2020). HFMSE ljestvica (Hammersmith Functional Motor Scale Expanded) je instrument za procjenu motoričkih funkcija kod djece sa spinalnom mišićnom atrofijom (SMA). Ova ljestvica je razvijena kao proširenje originalne Hammersmith Functional Motor Scale (HFMS) i fokusira se na procjenu motoričkih sposobnosti kao što su hodanje, sjedenje, stajanje, podizanje ruku, hvatanje i manipulacija predmetima (Ong, 2017.).

Terapija nusinersenom nije pokazala značajan učinak na ventilacijske funkcije. Međutim, uočen je slabiji napredak kod gutanja tako da se od osmero bez MIV-a samo njih dvoje prehranjuje sondom. Svi bolesnici, osim onih s tipom II., na IMV-u se i dalje prehranjuju sondom ili PEG-om (Barišić i sur., 2020).

Rezultati procjene na HFMSE ljestvici u bolesnika s dvije kopije gena SMN2 slični su onima u bolesnika s tri kopije (0-60 bodova), dok se u bolesnika s četiri kopije bilježe značajno više vrijednosti, između 49 i 54 boda (Barišić i sur., 2020).

Djeca koja imaju SMA tipa I prvenstveno pokazuju napredak u motoričkim sposobnostima i snazi distalnih mišića, ali ne značajno u aksijalnoj muskulaturi. Od sedmero djece s SMA tipa I, njih dvoje je postiglo sposobnost samostalnog sjedenja, a još dvoje može samostalno upravljati kolicima koristeći gornje udove, što predstavlja viši stupanj motoričkog razvoja koji nije očekivan u prirodnom tijeku bolesti. Sva djeca s tipom I i dalje koriste negativni tlak za disanje tijekom najviše osam sati dnevno, a samo jedno od osmero djece može jesti bez sonde (Barišić i sur., 2020).

### ***Biomarkeri***

Neurofilamenti teških lanaca su strukturni proteini prisutni u stanicama živčanog sustava, posebno u aksonima. Oni čine dio neurofilamentnog sustava koji pruža strukturalnu potporu i održava oblik neurona. Ovi proteini su važni za stabilnost i integritet neuronskih vlakana te su ključni za prijenos električnih impulsa duž neurona (Radaković, 2021). Neurofilamenti teških lanaca su proteini koji se nalaze u ranim fazama spinalne mišićne atrofije tipa I. Također su povišeni i u drugim neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove bolesti, multiple skleroze te amiotrifične lateralne skleroze. Oni su znak degeneracije neurona, ali su i dio njihovog normalnog procesa sazrijevanja. Zanimljivo, u ENDEAR studiji zabilježen je iznenađan pad vrijednosti neurofilamenta teških lanaca nakon samo dva mjeseca terapije nusinersenom. Povišena je i početna razina neuronske specifične enolaze (Barišić i sur., 2020).

Prema ocjeni 16 neuropedijataru iz Njemačke, Austrije i Švicarske, terapija nusinersenom ne donosi značajno kliničko poboljšanje kod najtežih bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom tipa I. Nije primijećeno značajno poboljšanje u funkciji gutanja ili respiratorne funkcije kod ovih pacijenata. Stoga, trajna invazivna ili neinvazivna mehanička ventilacija i dalje ostaje nužna, čak i uz primjenu nusinersena. Dokazivanje učinkovitosti liječenja ne zahtijeva nužno povećanje broja bodova jer je progresija bolesti prirodna. Stabilizacija bolesti, odnosno postizanje stacionarnog stanja, također može biti pokazatelj uspješnog liječenja. S druge strane, manje promjene u broju bodova, poput povećanja za 1-2 boda, možda nisu klinički primjetne (Barišić i sur., 2020).

Za bolesnike koji koriste MIV, pogoršanje motoričkih funkcija prema CHOP procjeni može biti razlog za prekid terapije. Preporučeno razdoblje za procjenu je od 12 do 24 mjeseca.

## **Risdiplam**

Risdiplam je mala molekula koja djeluje na pre-glasničku RNA pri prirodnom mjestu prekrajanja introna, potičući inkluziju egzona 7 i time povećavajući proizvodnju proteina SMN. Trenutno se provodi kliničko ispitivanje malih molekula poznatih kao risdiplam i branaplam, koji imaju isto djelovanje na inkluziju egzona 7 u gen SMN2, a mogu se primijeniti peroralno (Barišić i sur., 2020). U Sjedinjenim Američkim Državama, FDA je odobrila upotrebu risdiplama u kolovozu 2020. godine, dok je Europska agencija za lijekove (EMA) naknadno odobrila njegovu primjenu u Europi (Day i sur., 2022). Risdiplam ima visoku bioraspoloživost, primjenjuje se oralno jednom dnevno i prodire kroz krvno-moždanu barijeru u središnji živčani sustav i periferna tkiva, što je različito od nusinersena (Barišić i sur., 2020).

Učinkovitost risdiplama trenutno se procjenjuje putem kliničkih studija poput FIREFISH (za tip I.), SUNFISH (za tipove II. i III.) i Rainbowfish (za presimptomatske bolesnike). Prema rezultatima kliničkog ispitivanja (FIREFISH) za tip I., primjena risdiplama Roche RG7916 pokazuje značajan porast broja bodova prema CHOP ljestvici, pri čemu je u prosjeku više od 40 bodova zabilježeno kod 57% ispitanika. Rezultati za tip I. također pokazuju da je 17 ispitanika (70%) postiglo sposobnost samostalnog sjedenja ako je terapija započeta prije petog mjeseca starosti, dok je taj postotak 30% za one čija je terapija započela kasnije. U 71% bolesnika primijećeno je poboljšanje, a to je još izraženije kod onih koji su bili mlađi od 11 godina na početku terapije, dok je kod starijih od 11 godina taj postotak 42%. U Hrvatskoj se provode klinička ispitivanja risidiplama u sklopu SUNFISH studije za 12 bolesnika s tipovima II. i III., koji su samostalno nepokretni te FIREFISH studije za tip I., u kojoj sudjeluje jedan bolesnik (Barišić i sur., 2020).

**Branaplam** je mala molekula, a ostvaruje svoje učinke putem stabilizacije spliceosoma i povećanje ekspresije cjelovitog proteina SMN (<http://clinicaltrials.gov>, NCT02268552; Cheung i sur., 2018).

### 2.5.3. Genska terapija

Pod genskom terapijom podrazumijevamo lijekove koji sadrže rekombinantnu nukleinsku kiselinu (DNK ili RNK) kao aktivnu tvar, a koji se koriste kako bi nadoknadili, oporavili, zamijenili ili uklonili gensku sekvencu. U užem smislu, genska terapija nadomješta gubitak funkcije gena zbog mutacije ili nadoknade ekspresije gena (Barišić i sur., 2020).

U pretkliničkim studijama na miševima oboljelima od SMA, zamjena gena SMN1 primjenom adenoasociranih virusnih vektora rezultirala je širokom ekspresijom SMN proteina u kralježničkoj moždini i značajnim povećanjem preživljenja (Shorrock i sur., 2018). Studije provedene na primatima pokazuju da sistemski primijenjen AAV9-SMN1 (adeno-asocirani virus, serotip 9, koji sadrži komplementarnu DNA za SMN1) efikasno prelazi krvno-moždanu barijeru i rezultira ekspresijom transgena u mozgu, motoričkim neuronima kralježničke moždine, glija stanicama, te perifernim tkivima poput jetre, srca i skeletnih mišića (Bevan i sur., 2011).

Geni se mogu uklopiti u matičnu stanicu *in vivo* integrirajućim virusnim vektorom na poseban dio kromosoma koji se tako priključuje na stanice svakoj stanici kćeri. Virusni vektor s transgenom se smrzne i primjeni u bolesnika. Najvažnije je da bude stabilan, ne smije interferirati s funkcijom stanica te se mora dostaviti do ciljanih stanica. Terapija *in vivo* se može provesti i virusnim vektorom koji se ne integrira, ne replicira i ne uklapa u kromosom već djeluje episomski i uklapa se u neuron, dugoživuću stanicu i djeluje onoliko dugo koliko traje životni vijek stanice. Ubačena DNA se stabilizira ekstrakromosomski i zahtijeva *in vivo* primjenu gena. Postoji i *ex vivo* primjena gena koja podrazumijeva da se stanice pacijenta izdvoje i potom se transduciraju genom/transgenom te se nakon obrade vrte se pacijentu (Barišić i sur., 2020).

Najveći rizik se javlja kod insercijske mutageneze i kancerogeneze gdje se vektor nasumično ubacuje u DNA stanice, što može imati i negativne posljedice i kompromitirati njenu funkciju (Barišić i sur., 2020).

**Zolgensma** je upravo lijek koji ima ulogu nadomjestiti funkciju gena SMN1 zbog genske mutacije te omogućuje sintezu proteina SMN. Sami gen SMN1 se integrira u virusni vektor AAV9. Adeno udruženi virusni vektor 9 je vrlo malen, veličine 4,8 kb, ima jednostruku DNA te pripada porodici parvovirida. On djeluje episomski što znači da se ne replicira i ne uklapa u genom domaćina. Ovaj vektor se primarno integrira u neurone te stanice perifernih tkiva i organa poput jetre, srca i mišića,



a djeluje sve dok traje životni vijek stanice. Ovaj lijek ne dovodi do izlječenja SMA. Primjenjuje se jednokratno, intravenski te prelazi krvno-moždanu barijeru. Uspoređujući rezultate studija START i ENDEAR, Zolgensma produljuje životni vijek bolesnika u odnosu na spinrazu. U obzir treba uzeti i neke važne čimbenike START studije poput manjeg broja ispitanika, rjeđu ovisnost o trajnoj mehaničkoj ventilaciji, bolju motoričku funkciju i usvojene više stupnjeve motričkog razvoja. Dugotrajno liječenje ovom terapijom će biti dovršeno 2038. godine te se rezultati još uvijek očekuju (Barišić i sur., 2020). Primjena genske terapije pokazuje značajnu učinkovitost u presimptomskih bolesnika u kojih je primjena uslijedila kod bolesnika od tri dana starosti do šest tjedana, a rezultati pokazuju da su svi bolesnici sjedili samostalno, 92% ih je hodalo uz pomoć, a 88% bolesnika je samostalno hodalo. Vrlo slični rezultati postignuti su ranom primjenom nusinersena u presimptomskih bolesnika. Nakon jednokratne primjene Zolgensma izražen je porast proteina SMN u SŽS-u i u perifernim tkivima, što je rezultat centralnog i perifernog učinka. Nakon primjene pada broj transduciranih neurona, a broj transduciranih glija stanica se povećava. Budući da se stanice perifernih tkiva repliciraju, učinak genske terapije i broj transduciranih neurona se smanjuje. Kriteriji za primjenu u simptomatskih bolesnika: dob, trajanje bolesti i status motoričkih funkcija prije primjene te titar AAV (koncentracija virusnih čestica u otopini) manji ili jednak 50. Kriterij za primjenu u presimptomskih bolesnika je broj kopija SMN2, maksimalno tri kopije. Međutim, nema kliničkih dokaza o djelotvornosti kod starijih od 12 mjeseci.

Virusna genska terapija još nije široko prihvaćena u kliničkoj praksi. Zbog toga je potreban visok stupanj opreza i pažljiv nadzor liječenih pacijenata kako bi se procijenila dugoročna učinkovitost i sigurnost (Shorrock i sur., 2018).

### *Nuspojave*

Upotreba AAV9 virusnog vektora za neuroinflamaciju utječe na stražnje korijenove i ganglije, što dovodi do oštećenja kralježnične moždine s mononuklearnim infiltratima. To je potvrđeno na eksperimentalnim životinjama i obdukcijama preminulih pacijenata što klinički rezultira ataksijom. Neuroinflamatorni proces izazvan Zolgensmom potvrđuje se povišenim razinama antikapsidnih antitijela, T-staničnim odgovorom i povećanim brojem stanica u cerebrospinalnoj tekućini zajedno s histološkim dokazima upale i degenerativnih promjena stražnjih korijenova.

Obdukcija preminulog djeteta otkrila je difuznu leukoencefalopatiju koja je tijekom života bila praćena autonomnom disfunkcijom i epileptičkim napadima. Jedno dijete je doživjelo srčano-respiratorni zastoj u dobi od 15 mjeseci zbog miokarditisa, tri dana nakon primjene Zolgensma što je rezultiralo smrću. Dvoje djece razvilo je hidrocefalus u dobi od pet i 17 mjeseci što je zahtijevalo postavljanje ventrikuloperitonealne drenaže.

Intravenska primjena Zolgensme zahtijeva visoke doze AAV9 virusnog vektora, što izlaže imuni sustav i središnji živčani sustav velikim količinama virusnih čestica, uzrokujući kontinuirani T- i B-stanični imunološki odgovor. Visok rizik je prisutan kod povišenih vrijednosti jetrenih transaminaza prije početka terapije (Barišić i sur., 2020).

#### **2.5.4. Terapija STEM stanicama**

Studije koje se bave upotrebom matičnih stanica pružaju nadu kao potencijalna strategija za zamjenu oštećenih stanica u liječenju spinalne mišićne atrofije (SMA) te privlače značajnu pažnju istraživačke zajednice. Ova terapijska strategija može se ostvariti na dva načina: transplantacijom zrelih stanica dobivenih iz laboratorijski uzgojenih matičnih stanica ili poticanjem prirodnih matičnih stanica u tijelu da se razvijaju u potrebne tipove stanica. Trenutno, jedine terapije matičnim stanicama koje su u upotrebi uključuju transplantaciju koštane srži i mezenhimalnih stanica, no njihova primjena u liječenju SMA-e još nije dovoljno istražena. Istraživači su postigli značajan napredak koristeći primarne neuralne matične stanice izvedene iz leđne moždine u miševima s SMA-om što je rezultiralo poboljšanjem fenotipa bolesti. Također su pokazali potencijalnu terapijsku učinkovitost pluripotentnih matičnih stanica izvedenih iz embrijskih matičnih stanica ubrizgavajući ih u leđnu moždinu modela miša s ozbiljnim SMA-om. Nedavno su istraživači postigli uspjeh u generiranju induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPS) iz fibroblasta pacijenata što predstavlja važan korak prema razvoju genetski kompatibilnih stanica za terapiju matičnim stanicama (D'Amico i sur., 2011).

U stvarnim terapijskim uvjetima potrebno je biti svjestan trenutnih neizvjesnosti i ograničenja vezanih uz postojeće podatke. To uključuje relativno kratko trajanje kliničkih studija, mali broj sudionika, te korištenje različitih režima doziranja lijekova koji se ne mogu međusobno uspoređivati. Ukupna klinička korist i njezino trajanje za cijelu SMA populaciju još uvijek nisu u

potpunosti jasni, a nedostaju i podaci o učinkovitosti novih terapija kod blažih fenotipova ili kod pacijenata s duljim trajanjem bolesti (Kariyawasam i sur., 2018).

Starija djeca i odrasli koji čine dvije trećine ukupne populacije oboljelih od SMA često nisu dobili rani tretman zbog nedostatka dostupnih terapija, kliničkih ograničenja ili dobnih restrikcija za pojedine lijekove. Intratekalna primjena nusinersena predstavlja poseban izazov za pacijente s kontrakturama, skoliozom i spinalnom fuzijom, dok su risdiplam i zolgensma možda ograničeni na određene dobne skupine. Osobe s kasnijim početkom SMA koje su pokazale manja poboljšanja ili stabilizaciju motoričke funkcije tijekom ispitivanja nusinersena u studiji CHERISH možda nisu imale iste mogućnosti za napredak kao one koje su bile liječene ranije. Čak i kod onih koji su dobili rani tretman, postavlja se pitanje jesu li razine proteina SMN dovoljno visoke u svim motoričkim neuronima kako bi se zaustavila neurodegeneracija te je li disfunkcija motoričkih neurona potpuno reverzibilna. Privremeni rezultati iz studije NURTURE pokazali su da, iako je intervencija započeta rano, nisu sva dojenčad postigla dobno očekivane prekretnice poput samostalnog hodanja. Dodatno, zbog gubitka i disfunkcije motoričkih neurona u trenutku početka terapije tretirani pacijenti ostaju ranjivi na progresivni gubitak funkcije koji prati rast tijela i skeleta. SMA ne samo što utječe na motoričke neurone, već ostvaruje različite učinke na mišiće, plućnu funkciju i druge organe. Nedavno odobrene terapije za SMA mogu potpuno obnavljati SMN u svim tkivima i tipovima stanica, ali unatoč tome većina pacijenata s SMA-om još uvijek ima potrebe za poboljšanjem motoričke i mišićne funkcije. Lijekovi koji ne ovise o SMN-u mogu riješiti ove dodatne aspekte bolesti i dodatno unaprijediti motoriku i opće zdravlje. Iako terapije ovisne o SMN-u poboljšavaju motoričku funkciju, pacijenti liječeni terapijom ovisnom o SMN-u ne postižu najbolje rezultate u obnavljanju motorike i idealno bi imali koristi od pristupa koji cilja cijelu motornu jedinicu: tretmana koji optimizira obnavljanje SMN-a izravno djelujući na motorički neuron i tretmana koji povećava motoričku funkciju neovisno o SMN-u putem izravnih učinaka na mišić (Day i sur., 2022).

### **3. Zaključak**

Spinalna mišićna atrofija (SMA) predstavlja kompleksan medicinski izazov zbog svog nasljednog karaktera i molekularno-genetskih mehanizama. Otkriće gena SMN bilo je ključno za

razumijevanje patogeneze ove bolesti. Mutacije u genu SMN1 dovode do smanjenog stvaranja proteina SMN što rezultira gubitkom motoričkih neurona i progresivnom mišićnom slabošću. Tipovi SMA razlikuju se po težini simptoma i dobi početka bolesti, s tipovima I, II i III koji pokazuju različite kliničke slike i komplikacije.

Dijagnostika SMA oslanja se na genetsko testiranje koje potvrđuje prisutnost mutacija u genu SMN1. Rana dijagnoza je ključna za pravovremeni početak liječenja i poboljšanje ishoda za pacijente. Napredak u terapiji za SMA u posljednjem desetljeću transformirao je pristup liječenju ove bolesti.

Nusinersen (Spinraza) je prva odobrena terapija za SMA, koja djeluje povećanjem proizvodnje proteina SMN iz gena SMN2. Iako je Spinraza pokazala značajne koristi, nuspojave kao što su infekcije respiratornog trakta, konstipacija, trombocitopenija i renalna toksičnost zahtijevaju pažljivo praćenje pacijenata.

Genetska terapija Zolgensma koristi virusni vektor AAV9 za isporuku funkcionalnog gena SMN u stanice pacijenata što korigira osnovni genetski deficit. Unatoč značajnim poboljšanjima, primjena Zolgensme može izazvati ozbiljne nuspojave poput neuroinflamatornih procesa, difuzne leukoencefalopatije, miokarditisa i hidrocefalusa.

Uz Spinrazu i Zolgensmu, razvijeni su i drugi lijekovi poput risdiplama, koji poboljšava doradu (engl. splicing) gena SMN2, albuterol, akklarubicin, olesoksim i reldesemtiv. Ti lijekovi nude dodatne mogućnosti za liječenje, svaki s različitim mehanizmima djelovanja i potencijalnim nuspojavama.

Respiratorne komplikacije su glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u bolesnika sa SMA. Proaktivni pristup respiratornoj fizioterapiji i korištenje mehaničkih pomagala za čišćenje dišnih putova, ključni su za poboljšanje ishoda liječenja. Neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom (NIV) također igra važnu ulogu u održavanju respiratorne funkcije kod simptomatskih bolesnika.

Razumijevanje molekularno-genetskih mehanizama SMA, precizna dijagnoza, te pažljivo upravljanje i praćenje nuspojava terapije ključni su za poboljšanje kvalitete života pacijenata. Daljnja istraživanja i razvoj novih terapijskih strategija nužni su kako bi se osigurala još učinkovitija i sigurnija rješenja za oboljele od spinalne mišićne atrofije.

#### 4. Literatura:

1. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve*, 2014, 51(2), 157–167.
2. Barišić N., Ivanović V., Lehman I., & Grđan, P. (2013). Spinalna mišićna atrofija-molekularna genetika u dijagnostici i terapiji. *Pediatrics Croatica*, 57(4), 338-343.
3. Barišić N., Vukić V., Lehman I., Novak M., Đapić T., Sertić J., Bošnjak Nađ K., Kern I., Najdanović B., Omerza L., Braovac D., Bartoniček D., Turudić D., Tomas J. (2020). Iskustva u liječenju bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom u Hrvatskoj – pozitivni rezultati praćenja iz nacionalnog registra i novi izazovi. *Paediatr Croat*. 64, 236-51.
4. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci*. 2019 Jul 8;42:385-406. doi: 10.1146/annurev-neuro-070918-050501. PMID: 31283897; PMCID: PMC7427431.
5. Bevan AK, Duque S, Foust K, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AHM, Kaspar BK. Systemic Gene Delivery in Large Species for Targeting Spinal Cord, Brain, and Peripheral Tissues for Pediatric Disorders. *Mol Ther*, 2011, 19(11), 1971–1980.
6. Burghes AHM, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosc*, 2009, 10(8), 597–609.
7. Burnett BG, Mun E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH. Regulation of SMN Protein Stability. *Mol Cel Biol*, 2009, 29(5), 1107–1115.
8. Cheung AK, Hurley B, Kerrigan R, Shu L, Chin DN, Shen Y, O'Brien G, Sung MJ, Hou Y, Axford J, Cody E, Sun R, Fazal A, Fridrich C, Sanchez CC, Tomlinson RC, Jain M, Deng L, Hoffmaster K, Song C, Van Hoosear M, Shin Y, Servais R, Towler C, Hild M, Curtis D, Dietrich WF, Hamann LG, Briner K, Chen KS, Kobayashy D, Sivasankaran R, Dales NA. Discovery of Small Molecule Splicing Modulators of Survival Motor Neuron-2 (SMN2) for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J Med Chem*, 2018, 61(24), 11021–11036.

9. Claborn MK, Stevens DL, Walker CK, Gildon BL. Nusinersen: A Treatment for Spinal Muscular Atrophy. *Ann Pharmacother*, 2018, 53(1), 1–9.
10. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Nov 2;6:71. doi: 10.1186/1750-1172-6-71. PMID: 22047105; PMCID: PMC3231874.
11. Darras BT. Spinal muscular atrophies. *Ped Clin North Am*, 2015, 62, 743–766.
12. Day JW, Howell K, Place A, Long K, Rossello J, Kertesz N, Nomikos G. Advances and limitations for the treatment of spinal muscular atrophy. *BMC Pediatr*. 2022 Nov 3;22(1):632. doi: 10.1186/s12887-022-03671-x. PMID: 36329412; PMCID: PMC9632131.
13. Finkel RS i sur. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28(2), 103–115.
14. Finkel, R.S., McDermott, M.P., Kaufmann, P. i suradnici (2016). Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*, 83(9), 810-817.
15. Fujak A, Kopschina C, Gras F, Forst R, Forst J. Contractures of the lower extremities in spinal muscular atrophy type II. Descriptive clinical study with retrospective data collection. *Ortop Traumatol Rehabil*, 2011, 13(1), 27–36.
16. Hwee DT, Kennedy AR, Hartman J, Ryans J, Durham N, Malik FI, Jasper JR. The Small-Molecule Fast Skeletal Troponin Activator, CK-2127107, Improves Exercise Tolerance in a Rat Model of Heart Failure. *J Pharmacol Exp Therap*, 2015, 353(1), 159–168.
17. Iannaccone ST. Modern Management of Spinal Muscular Atrophy. *J Child Neurol*, 2007, 22(8), 974–978.
18. Kariyawasam D, Carey K, Jones KJ, Farrar MA. New and developing therapies in spinal muscular atrophy. *Paediatr Resp Rev*, 2018, 28, 3–10.
19. Kolb SJ, Kissel, JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin*, 2015, 62(3), 831–846.
20. Lehman, I. (2020). Spinalna mišićna atrofija (SMA): znamo li sve o prvim simptomima i važnosti ranog postavljanja dijagnoze? *Pediatrics Croatica*, 64(4), 230-234.

21. Lorson CL. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*, 1998, 19, 74–78.
22. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11), 6307–6311.
23. Macleod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*, 1999, 3(2), 65–72.
24. Mercuri E i sur. SMA THERAPIES II AND BIOMARKERS: P.255-SUNFISH Part 1: RG7916 treatment results in a sustained increase of SMN protein levels and the first clinical efficacy results in patients with type 2 or 3 SMA. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28, 108.
25. Nash LA, Burns JK, Chardon JW, Kothary R, Parks RJ. Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? *Curr Mol Med*, 2016, 16, 779–792.
26. Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2019, 24(3), 194–203.
27. Ong et al. (2017). "The Hammersmith Functional Motor Scale - Expanded: Validation of a Scoring System in Spinal Muscular Atrophy Type II and III." *Journal of Child Neurology*, 32(9), 871-879.
28. Radaković et al. (2021). "Neurofilament proteins as body fluid biomarkers of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis."
29. Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46(4), 1584–1600.
30. Shorrock HK, Gillingwater TH, Groen EJM. Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs*, 2018, 78(3), 293–305
31. Singh RN, Howell Mf, Ottesen EW, Singh NN. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, 1860(3), 299–315.
32. Sunyach C i sur. Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology*, 2012, 62(7), 2346–2353.

33. Thomas NH, Dubowitz V. The Natural History of Type 1 (Severe) Spinal Muscular Atrophy. *Neuromuscul Dis*, 1994, 4(5), 497–502.
34. Wang CH i sur. Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy. *J Child Neurol*, 2007, 22(8), 1027–1049.
35. Weber JJ, Clemensson LE, Schiöth HB, Nguyen HP. Olesoxime in Neurodegenerative Diseases: Scrutinising a Promising Drug Candidate. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jul 5. pii: S0006-2952(19)30257-6
36. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, HausmanowaPetrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci*, 1997, 146(1), 67–72.