

Univerzitet u Beogradu

Medicinski fakultet

Ivan V. Marjanović

KLINIČKO GENETSKA ANALIZA  
PACIJENATA SA FAMILIJARNOM  
AMIOTROFIČKOM LATERALNOM  
SKLEROZOM U POPULACIJI SRBIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2018

University of Belgrade

School of Medicine

Ivan V. Marjanović

CLINICAL AND GENETIC ANALYSIS OF  
PATIENTS WITH FAMILIAR  
AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS  
IN SERBIAN POPULATION

doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentor: Prof. dr Zorica Stević, redovni profesor  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Dragana Lavrnić, redovni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ranko Raičević, redovni profesor  
Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Mojim roditeljima*

## REZIME

Uvod: Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) nastaje usled primarnog oštećenja motornih neurona na nivou kore velikog mozga, jedara moždanog stabla i prednjih rogova kičmene moždine. Oko 90% ALS pacijenata čini tzv. sporadičnu ALS (SALS), dok 5-10% pacijenata ima genetsku ili familijarnu osnovu bolesti (FALS). Do sada je opisano više od 20 gena povezanih sa ALS. Nisu poznate epidemiološke i kliničke karakteristike pojedinih formi FALS u Srbiji. U svetu nedostaju podaci o zahvaćenosti centralnog nervnog sistema (CNS) u sklopu FALS.

Ciljevi ovog istraživanja su bili: molekularno-genetsko ispitivanje pacijenata sa ALS na prostoru Srbije; određivanje tipičnih kliničkih znakova u subpopulaciji pacijenata sa FALS; ispitivanje korelacija kliničkih i genetskih karakteristika, uključujući poređenje nalaza neuropsihološkog testiranja i morfoloških specifičnosti mozga i kičmene moždine analiziranih pomoću savremenih metoda magnetne rezonancije (MR).

Metod: U ovo ispitivanje uključen je 241 pacijent iz hospitalnog registra Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Pacijenti su testirani na sledeće mutacije: SOD1 (svih 5 egzona), TDP 43 (egzon 6), FUS (egzoni 14 i 15), c9orf72 i ANG. Genetska grupa od 37 ispitanika poređena je klinički sa 32 SALS pacijenta bez verifikovane mutacije. Neuropsihološko testiranje je sprovedeno kod 22 SOD1 pozitivna ispitanika, 5 SOD1 negativnih ispitanika pozitivnih na druge ALS gene i 82 zdrave kontrole. Primenjivani su testovi za kognitivni skrining, procenu opšteg intelektualnog nivoa, pažnje, pamćenja, vizuospacijalnih i konstrukcionih, egzekutivnih i jezičkih funkcija. Od 69 pacijenata sa ALS, MR pregledom mozga i vratnog dela kičmene moždine na aparatu od 1,5T je obuhvaćena grupa od 23 genetski determinisanih pacijenata i 11 iz grupe SALS. Kontrolna grupa bila je sastavljena od 34 uparena zdrava ispitanika. Analizirana je debljina korteksa, mikrostruktura puteva bele mase, funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja, kao i analiza strukture kičmene moždine.

Rezultati: Ukupno 37 (15,4%) od 241 pacijenta imalo je jednu ili više mutacija u testiranim ALS genima. U genetskoj grupi 27 pacijenata je imalo mutaciju u SOD1 genu (72,9%), šest pacijenata je imalo mutaciju u genu za c9orf72 (16,2 %), dva pacijenta mutaciju u ANG genu (5.4%), jedan pacijent je imao mutaciju u TDP43 genu (2,7%), a jedan kombinovanu mutaciju c9orf72, FUS i ANG (2,7%). Svi SOD1 pozitivni pacijenti

imali su spinalni početak bolesti i u većini slučajeva (85,2%) prvi simptomi su bili u donjim udovima. Bulbarni početak je bio češći kod SOD1 negativnih FALS pacijenata. Senzitivni poremećaji su zabeleženi kod 14 (51,9%) SOD1 pozitivnih i dva (20,0%) SOD1 negativna pacijenta ( $p > 0,05$ ). Poremećaji sfinktera registrovani su samo u SOD1 pozitivnoj grupi ( $p < 0,01$ ). Opšti kognitivni skrining je pokazao lošije rezultate kod ALS u poređenju sa zdravima ( $p < 0,01$ ). SOD1 pozitivni pacijenti su postigli znatno niži rezultat na egzekutivnom testu nego zdrave kontrole ( $p < 0,01$ ). Sa druge strane, SOD1 negativni pacijenti su pokazali lošiji rezultat u: opštem intelektualnom nivou, verbalnoj i vizuospatijalnoj memoriji, egzekutivnoj funkciji ( $p < 0,01$ ), pažnji, kao i jezičkim funkcijama ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa zdravim kontrolama. Nisu utvrđene značajne razlike između pacijenata sa SOD1 ALS, SALS pacijenata i zdravih kontrola u debljini korteksa. U poređenju sa zdravim kontrolama, SALS pacijenti imali su značajno smanjenje frakcione anizotropije i levog i desnog kortikospinalnog puta ( $p = 0,001$  i  $p = 0,02$ ) i povećanu radijalnu difuzivnost levog kortikospinalnog puta ( $p = 0,01$ ). Pacijenti sa SOD1 ALS imali su promene koje su bile između kontrola i SALS pacijenata ( $p = 0,06$ ). Posmatrajući sensorimotornu mrežu, SALS pacijenti su pokazali povećanu funkcionalnu povezanost desnog precentralnog korteksa u poređenju sa kontrolama, što pokazuju i voxel-wise analiza i analiza regiona od interesa (ROI) (Grafikon 2). Uz to, ROI analiza je pokazala povećanu funkcionalnu povezanost i levog precentralnog korteksa pacijenata sa SALS u odnosu na kontrole ( $p = 0,05$ ). SOD1 ALS pacijenti imali su značajno smanjenje srednje vrednosti površine poprečnog preseka cervikalne kičmene moždine od nivoa C2 do nivoa C7 u odnosu na SALS pacijente.

**Zaključak:** U populaciji pacijenata sa ALS na prostoru Srbije, oko 15% je imalo genetsku osnovu bolesti, pri čemu su mutacije u SOD1 genu činile više od dve trećine. Pacijenti sa SOD1 ALS su često imali spinalni početak bolesti, senzorne i sfinkterijalne smetnje, egzekutivnu disfunkciju, te oštećenje kortikospinalnog puta i atrofiju kičmene moždine. SOD1 negativni FALS pacijenti su obično imali bulbarni početak bolesti i širu afekciju kognitivnih funkcija.

**Ključne reči:** amiotrofična lateralna skleroza (ALS), SOD1 gen, c9orf72, kognicija, difuzioni tenzorski imidžing, debljina korteksa, funkcionalna povezanost mozga, atrofija kičme moždine

**naučna oblast:** medicina; uža naučna oblast: neurologija

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is caused by damage of motor neurons in brain cortex, brainstem and the spinal cord. About 90% of ALS patients have sporadic disease form (SALS), while 5-10% of patients have a genetic or familial disease (FALS). So far, more than 20 genes have been associated with ALS. The epidemiological and clinical characteristics of certain forms of FALS in Serbia are not known. Furthermore, there is a lack of data on central nervous system (CNS) involvement in FALS worldwide, both in terms of neuroimaging and cognitive testing.

The objectives of this research were: molecular-genetic testing of ALS patients in Serbia; determination of typical clinical signs in subpopulation of patients with FALS; correlations of clinical and genetic characteristics, including neuropsychological testing and morphological specificities of the brain and spinal cord analyzed using modern magnetic resonance imaging (MRI) methods.

**Method:** This study included 241 patients from the Neurology Clinic, Clinical Center of Serbia. Patients were tested for the following mutations: SOD1 (all 5 exons), TDP 43 (exon 6), FUS (exon 14 and 15), c9orf72 and ANG. A genetic group of 37 subjects was compared clinically with 32 SALS patients without a verified mutation. Neuropsychological testing was performed in 22 SOD1 positive subjects, 5 SOD1 negative subjects positive for other ALS genes and 82 healthy controls (HCs). Cognitive screening, as well as tests of general intellectual level, attention, memory, visuospatial, executive and linguistic functions were applied. Of the 69 patients with ALS, MRI examination of the brain and cervical spinal cord on the 1.5T equipment were conducted on 23 genetically determined patients and 11 SALS subjects. The control group was composed of 34 subjects matched for gender and age. Cortical thickness analysis, white matter microstructural assessment, functional MRI at resting state, and the analysis of the spinal cord were made.

**Results:** A total of 37 (15.4%) of 241 patients had one or more mutations in tested ALS gene. In the genetic group, 27 patients had a mutation in the SOD1 gene (72.9%), six patients had a mutation in the c9orf72 gene (16.2%), two in the ANG gene (5.4%), one in the TDP43 gene (2.7%), and one had combined mutations of c9orf72, FUS and ANG (2.7%). All SOD1 positive patients had the spinal onset of the disease, and in most

cases (85.2%), the first symptoms were in the lower limbs. The bulbar start was more common in SOD1 negative FALS patients. Sensory disorders were observed in 14 (51.9%) SOD1 positive and two (20.0%) SOD1 negative patients ( $p>0.05$ ). Sphincter disorders were registered only in the SOD1 positive group ( $p<0.01$ ). General cognitive screening showed poorer results in ALS compared to HCs ( $p<0.01$ ). SOD1 positive patients achieved a significantly lower result on an executive tests than HCs ( $p<0.01$ ). On the other hand, SOD1 negative patients showed worse results in: general intellectual level, verbal and visuospatial memory, executive functions ( $p <0.01$ ), attention and linguistic functions ( $p<0.05$ ) compared to HCs. Significant differences were not found between patients with SOD1 ALS, SALS patients and HCs regarding cortical thickness. Compared to HCs, SALS patients had a significant reduction in fractional anisotropy in both left and right corticospinal pathways ( $p=0.001$  and  $p=0.02$ ) and increased radial diffusivity of the left corticospinal pathway ( $p=0.01$ ). Patients with SOD1 ALS were between controls and SALS patients ( $p=0.06$ ). Regarding the sensorimotor network, SALS patients showed an increased functional correlation of the right prefrontal cortex compared to controls, which is shown both by voxel-wise analysis and analysis of the region of interest (ROI). In addition, ROI analysis showed increased functional correlation of left prefrontal cortex of patients with SALS compared to controls ( $p=0.05$ ). SOD1 ALS patients compared to SALS patients had a significant reduction in mean surface area of the cervical spinal cord cross-section from level C2 to level C7.

**Conclusion:** In the population of ALS patients in Serbia, about 15% had a genetic basis of the disease, with mutations in the SOD1 gene comprising more than two thirds of FALS cases. Patients with SOD1 ALS often had spinal disease onset, sensory and sphincteric disturbances, executive dysfunction, as well as corticospinal damage and the spinal cord atrophy. SOD1 negative FALS patients usually had bulbar onset and a broader cognitive dysfunction.

**Key words:** amyotrophic lateral sclerosis (ALS), SOD1 gene, c9orf72, cognition, diffusion tensor imaging, cortical thickness, functional brain MRI, spinal cord atrophy

**scientific field:** medicine; **narrow scientific field:** neurology



## SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ISTORIJAT AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE	1
1.2. ISTORIJAT FAMILIJARNE AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE (FALS)	3
1.3. ETIOPATOGENEZA ALS	4
1.3.1. Eksicotokičnost i uloga jona kalcijuma	4
1.3.2. Oksidativni stres	5
1.3.3. Agregacija proteina narušene konformacije	6
1.3.4. Disfunkcija sekretornog puta	6
1.3.5. Disfunkcija mitohondrija	7
1.3.6. Agregacija neurofilamenata i poremećen aksonalni transport	7
1.3.7. Deficit neurotrofičkih faktora i disfunkcija signalnih puteva	8
1.3.8. Poremećaj metabolizma RNK	8
1.3.9. Inflamacija kao patogenetski mehanizam ALS	9
1.3.10. Apoptoza	10
1.4. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE ALS	11
1.5. EPIDEMIOLOGIJA ALS	13
1.6. KLINIČKA SLIKA ALS	14
1.6.1. Fenotipska klasifikacija ALS	15
1.7. DIJAGNOZA ALS	19
1.7.1. Dijagnoza FALS	23
1.7.2. ALS plus sindromi	25
1.7.3. Dijagnostički El Escorial kriterijumi (revizija iz 2015. godine)	26
1.8. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA ALS („ALS MIMIC“)	28
1.9. ULOGA MAGNETNE REZONANCE U DIJAGNOSTICI ALS	30
1.10. NEUROPSIHOLOŠKA PROCENA PACIJENATA SA AMIOTROFIČNOM LATERALNOM SKLEROZOM	33
1.11. LEČENJE PACIJENATA SA ALS	34
1.12. GENETSKA OSNOVA ALS	35
1.12.1. ALS1 (mutacija u genu za Cu/Zn superoksid dismutazu – SOD1)	37
1.12.2. ALS 2 (alsin)	39
1.12.3. ALS 3	39
1.12.4. ALS 4 (senataksin)	39
1.12.5. ALS 5 (spatacsin SPG11)	40
1.12.6. ALS 6 (fuzionisan u sarkomu, FUS)	40
1.12.7. ALS 7	41
1.12.8. ALS 8 (vesicle-associated membrane protein-associated, synaptobrevin-associated membrane protein B - VAPB)	41
1.12.9. ALS 9 (angiogenin - ANG)	41
1.12.10. ALS 10 (transaktivni DNK, RNK-vezujući protein - TDP-43)	42
1.12.11. ALS 11 (indukovan faktor 4 - FIG4)	43
1.12.12. ALS 12 (optineurin - OPTN)	43
1.12.13. ALS 13 (ataksin-2 - ATXN2)	43
1.12.14. ALS 14 (protein koji zadrži valozin - VCP)	44
1.12.15. ALS 15 (ubiquillin 2 - UBQLN2)	44
1.12.16. ALS 16 (sigma ne-opioidni intracelularni receptor 1 - SIGMAR)	44
1.12.17. ALS 17 ( hromatin modifikujući protein 2B - CHMP2B)	44

1.12.18. ALS 18 (profilin 1 - PFN1)	45
1.12.19. ALS 19 (v-erb-b2 receptor tirozin kinaze 4 - ERBB4)	45
1.12.20. ALS 20 (heterogeni ribonuklearni protein A1 - hnRNPA1)	45
1.12.21. ALS 21 (matrin 3 - MATR3)	45
1.12.22. ALS-FTD1 (c9orf72 mutacija)	46
1.12.23. ALS-FTD2 (CHCHD10)	46
1.12.24. Serin/treonin (TANK)-vezujuća kinaza 1 (TBK1)	46
1.13. ZNAČAJ KLINIČKO-GENETSKE ANALIZE KOD PACIJENATA SA GENETSKOM I/ILI FAMILIJARNOM ALS	49
1.14. GENSKA TERAPIJA ALS	50
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	51
3. MATERIJAL I METODE	52
3.1. PACIJENTI	52
3.2. MOLEKULARNO-GENETSKO ISPITIVANJE	52
3.2.1. Izolovanje genomske DNK iz limfocita periferne krvi	53
3.2.2. Lančana reakcija polimerizacije	53
3.2.3. Kapilarna elektroforeza	55
3.2.4. Sekvenciranje uzoraka	55
3.2.5. Fragmentna analiza	57
3.3. ANALIZA SOCIODEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA ISPITIVANIH PACIJENATA	57
3.4. NEUROPSIHOLOŠKO TESTIRANJE	60
3.4.1. Primenjivani testovi	60
3.5. PREŽIVLJAVANJE	64
3.6. NEURORADIOLOŠKO ISPITIVANJE - MAGNETNA REZONANCA	65
3.6.1. Tehnički parametri MR	65
3.6.2. Analiza mozga na MR	66
3.6.2.1. Debljina korteksa	66
3.6.2.2. Mikrostruktura puteva bele mase	66
3.6.2.3. Funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja	67
3.6.2.4. Analiza kičmene moždine pomoću MR	68
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	69
4. REZULTATI	71
4.1. SOCIODEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA GENETSKOM ALS	71
4.1.1. Grupna analiza	71
4.1.2. Fenotipska analiza podgrupa pacijenata sa određenim mutacijama	77
4.1.2.1. Analiza pacijenata sa mutacijom u SOD1 genu	77
4.1.2.2. Analiza pacijenta sa c9orf72 mutacijom	81
4.1.2.3. Analiza pacijenata sa mutacijom u ANG genu	82
4.1.2.4. Analiza pacijenta sa mutacijom u TDP43 genu	83
4.1.2.5. Analiza pacijenta sa mutacijom u c9orf72, FUS i ANG genu	83
4.2. REZULTATI NEUROPSIHOLOŠKOG TESTIRANJA KOD PACIJENATA SA GENETSKOM ALS I PACIJENATA SA SPORADIČNOM ALS	83

4.3. UTICAJ SOCIODEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA PACIJENATA NA PREŽIVLJAVANJE	84
4.4. STRUKTURNE PROMENE MOZGA I KIČMENE MOŽDINE KOD PACIJENATA SA GENETSKOM ALS – ANALIZA POMOĆU MR	88
4.4.2. Debljina korteksa	90
4.4.3. Putevi bele moždane mase	91
4.4.4. Funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja	91
4.4.5. MR cervikalne kičme	94
4.4.6. Korelacije kliničkih podataka sa nalazima na MR	94
5. DISKUSIJA	98
6. ZAKLJUČCI	110
7. LITERATURA	112

## **1. UVOD**

### **1.1. ISTORIJAT AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE**

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurološki entitet poznat više od 150 godina, i smatra se progresivnim neurodegenerativnim oboljenjem koje nastaje usled primarnog oštećenja motronih neurona na nivou kore velikog mozga, jedara moždanog stabla i prednjih rogova kičmene moždine (Leigh et al. 1991). Međutim, sa napredovanjem procesa razjašnjenja etiopatogeneznih mehanizama bolesti, ALS se više ne može smatrati samo bolešću motornog neurona. Naime, danas se ALS sagledava kao multifaktorijalni sindrom i multisistemska bolest sa postojanjem, osim motornih, i ekstrapotornih promena u frontotemporalnom korteksu, hipokampusu, talamusu, substanciji nigri, spinocerebelarnom traktu, dorzalnim kolumnama i perifernim nervima (Turner et al. 2013). Ipak, i posle svih novih otkrića, bolest je neizlečiva i kod najvećeg broja obolelih pacijenata, bolest se završava smrtnih ishodom nakon 2-5 godina od nastanka prvih simptoma bolesti usled razvoja teške respiratorne insuficijencije.

Prvi opis bolesti dali su Duchenne i Aran (1849-1850), koji su na osnovu fenotipa ispoljavanja bolesti (progresivnog gubitka mišićne mase) inicijalno bolest nazvali progresivna mišićna atrofija. Cruveilhier (1853) je ukazao da patofiziološki proces obuhvata prednje (motorne) spinalne korenove i da se može smatrati bolešću koja nastaje usled poremećaja u nivou kičmene moždine. Ubrzo je usledila i studija u kojoj je Luys (1860) uočio po prvi put oštećenje sive mase prednjih rogova kičmene moždine u okviru ovog entiteta. Devet godina kasnije, Charcot je opisom oštećenja kortikospinalnog puta kao krucijalnog za objašnjenje kliničkog ispoljavanja ALS, finalizovao ceo proces dotadašnjih istraživanja i od tada je bolest poznata kao amiotrofična lateralna skleroza.

ALS se klinički karakteriše istovremenim znacima oštećenja gornjeg (centralnog) (GMN) i donjeg (perifernog) motornog neurona (DMN), koji na samom početku nisu podjedanko izraženi. Termin bolest motornog neurona (BMN) je prvi sugerisao Brain 1962.godine, a dvadeset godina kasnije Rowland je predložio prvu klasifikaciju implikujući da termin "bolest motornog neurona" jedini odgovara ALS, dok bi termin "bolesti motornog neurona", označavao heterogenu grupu bolesti koja se patoanatomski može locirati na prednje robove kičmene moždine, jedra moždanog

stabla i /ili motorni korteks (Katz et al. 2015). Iako je ova podela još uvek aktuelna, u literaturi se najčešće pod bolestima motornog neurona (BMN) označavaju druge bolesti motornog neurona dok se umesto termina bolest motornog neurona u jedinini (BMN) koristi ALS, kao što će biti nadalje korišćeno i u sadašnjem tekstu.

U ovim klasifikacijama BMN, bolesti su podeljene na nasledne (genetske) i stečene, pri čemu se insistira na dihotomiji etiologije opisanih promena u vremenu, kada se poznavala veoma oskudna genetska osnova pojedinih entiteta (Tabela 1.) I pored, na prvi pogled jasne klasifikacije, vremenom su se u kliničkoj praksi pojavljivali i opisivali entiteti koji su ličili, a nisu zadovoljavali kriterijume da bi se nazvali BMN tj. ALS, što je dodatno unelo zabunu u raznolikosti ispoljavanja oštećenih motornih neurona. Tako je 1904. godine od strane Siller-a, opisan entitet dominantnog oštećenja gornjeg motornog neurona sa razvojem pseudobulbarne paralize bez prisutnih znakova oštećenja donjeg motornog neurona. Ovaj entitet danas je poznat kao primarna lateralna skleroza, i smatra se subentitetom stečene BMN. U ovu grupu tzv.subentiteta svrstavaju se i progresivna mišićna atrofija i progresivna bulbarna/ pseudobulbarna paraliza, kao i primarno, fokalne forme bolesti kao što su sindrom brahijalne diplegije („flail arm“ (FA) sindrom) i „flail legs“ (FL) sindrom.

Klasifikacija na stečene i familijarne oblike BMN i danas je predmet polemike, s obzirom na sadašnje stanovište etiopatogeneze bolesti koja sugerise interakciju genetskih i faktora spoljašnje sredine, ne samo kod genetski determinisanih već i sporadičnih formi bolesti.

Tabela 1. Klasifikacija bolesti motornog neurona (BMN) (Rowland, 1982)

<b>Stečene bolesti motornog neurona</b>	<b>Nasledne bolesti motornog neurona</b>
Amiotrofična lateralna skleroza (ALS)	Spinalna mišićna atrofija (SMA)
Progresivna (spinalna) mišićna atrofija	Bulbospinalna atrofija (Morbus Kennedy)
Progresivna bulbarna mišićna atrofija (paraliza)	Hereditarna spastična parapareza (HSP)
Monomelična amiotrofija	Familijarna ALS (FALS)
Poliomijelitis	
Toksične BMN	
Paraneoplastične BMN	

## 1.2. ISTORIJAT FAMILIJARNE AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE (FALS)

Prvi opis mogućnosti familijarnog ispoljavanja bolesti dao je još Aran 1850. godine na osnovu porodičnog ispoljavanja „progresivne mišićne atrofija“, kod pacijenta/probanda, čija su sestra i dva ujaka imali sličnu kliničku sliku sa predominantnim oštećenjem DMN u kliničkoj prezentaciji. Osler je 30 godina kasnije opisao prvu porodicu sa autozomno-dominantnim (AD) nasleđivanjem ALS-a. Međutim, do 1993. godine genetska osnova bolesti je bila pretpostavka i praćena je samo verifikovanjem principa Mendeljejevog tipa nasleđivanja (bilo da se radilo o dominantnom, recivnom, ili X vezanom). Tada je Rosen sa sarednicima otkrio prvu mutaciju gena za Cu/Zn superoksid dismutazu (SOD1) i dokazao genetsku osnovu pojedinh formi bolesti. Od tada do danas otkriveno je više od 24 gena koji se mogu povezati sa određenim kliničkim fenotipom familijarne ALS (FALS), ali su genetske promene verifikovane i kod sporadičnih (SALS) pacijenata. Tokom perioda 2006-9. godine verifikovane su dodatno mutacije gena za transaktivni DNK RNK -vezujući protein (TDP 43), (Kabashi et al.; Sreedharan et al.; Yokoseki et al.) kao i gena za protein fuzionisan u sarkomu (FUS) (Kwiatkowski et al.; Vance et al.). Ubrzo nakon ovih otkrića utvrđeno je da je patološki izmenjen hiperfosforilisani TDP 43 protein, glavni sastojak ubikvitinskih inkluzija i ujedno najznačajniji patohistološki biomarker ALS. Epohalno otkriće usledilo je 2011. godine kada je verifikovana patološka ekspanzija heksanukleotidnih ponovaka na 9 hromozomu c9orf72 (DeJesus Hernandez et al.; Renton et al.), koja po najnovijim istraživanjima u većini zemalja Evrope i Severne Amerike predstavlja najčešći genetski defekt kod genetski determinisane i familijarne forme ALS. Pored toga, ovaj oblik ekspanzije (10-30% pacijenata sa frontotemporalnom demencijom (FTD)) zajedno sa retkim mutacijama drugih gena za optineurin (OPN), ubikvilin (UBQLN2), valozin (VCP) su potvrdili hipotezu o zajedničkom patoanatomskom i kliničkom kontinuumu dve neurodegenerativne bolesti kao što su ALS i frontotemporalna demencija (FTD). Postojanje ubikvitinskih TDP 43 pozitivnih inkluzija (koje se mogu naći i u patohistološkim nalazima postmortem kod FTD pacijenata) kao zajedničkog imenioca, formirana je jedna nova grupa bolesti koje zbirno nose naziv TDP 43 proteinopatije.

### 1.3. ETIOPATOGENEZA ALS

Iako je postignut izuzetan napredak u naučnim istraživanjima ALS, uzrok smrti i degeneracije motornih neurona i dalje je nepoznat. Otkriće patoloških formi mutiranih enzima (pre svega mutacija SOD1 gena) uticalo je na ispitivanje značaja genetskih činilaca u etiopatogenezi ne samo familijarnih već i ostalih sporadičnih oblika BMN. Pored supstrata ćelijske smrti, apoptoze motornih neurona, danas je poznato da su u patogenezi bolesti uključene i druge ćelije uključujući gliju, interneurone, endotelijalne ćelije, kao i ćelije koje modifikuju imuni odgovor. Savremeni koncept bazira se na tome da je ALS multifaktorijalna bolest u kojoj učestvuju različiti mehanizmi koji dovode do smrti motornih neurona kao što su: ekscitotoksičnost izazvana glutatom, oksidativni stres, agregacija proteina narušene konformacije, disfunkcije sekretornog puta, disfunkcija mitohondrija, narušen aksonski transport, nedostatak faktora rasta i inflamacija. Na eksperimentalnim *in vivo* modelima ALS, naročito transgenom modelu miša i pacova, uočeno je prisustvo citoplazmatskih inkluzija i u astrocitima u okruženju motornih neurona, koji dodatno potenciraju i ubrzavaju toksični efekat pomenutih primarnih mehanizama ne samo u motornom koreteksu već i drugim regionima mozga i kičmene moždine (Bruijn et al, 1998; Rosenblum et al, 2017).

#### 1.3.1. Ekscitotoksičnost i uloga jona kalcijuma

Glutamat je neurotransmiter koji se u fiziološkim uslovima oslobađa iz presinaptičkog neurona egzocitozom i aktivira glutamatne receptore na postsinaptičkom neuronu, povećavajući propustljivost za jone  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  koji ulaze u ćeliju, izazivaju depolarizaciju postsinaptičke membrane i genezu akcionog potencijala. Oštećenje neurona koje nastaje zbog preterane aktivacije glutamatnih receptora označava se kao ekscitotoksičnost. Ovaj koncept je zasnovan na zapažanju da prekomerna koncentracija glutamata koji može da aktivira NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-propanoična kiselina) receptore može da indukuje umiranje neurona. Ekscitotoksičnost može da bude prouzrokovana i narušenim preuzimanjem glutamata iz vanćelijskog prostora uključujući i sinaptičke pukotine. U poslednjih nekoliko decenija postoji veliki broj eksperimentalnih dokaza da ekscitotoksičnost

ima vodeću ulogu u patogenezi ALS (Coyle & Puttfracken, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Doble, 1999). U sinaptozomima izolovanim iz bolešću zahvaćenih delova mozga i kičmene moždine ALS pacijenata utvrđeno je narušeno preuzimanje glutamata (Rothstein et al., 1992; Shaw et al., 1994). Selektivni gubitak astroglijalnog glutamatnog transportera EAAT2 (*eng.* excitatory amino acid transporter 2) utvrđen je u regijama motornog korteksa i kičmene moždine SALS i FALS pacijenata (Sasaki & Iwata, 2000) i u ventralnom rogu mutantnih SOD1 miševa i pacova (Bendotti et al., 2001; Howland et al., 2002). Takođe je pokazano, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima, da gubitak EAAT2 dovodi do selektivne degeneracije motornih neurona (Rothstein, 1996), kao i da stimulacija ekspresije EAAT2  $\beta$ -laktam antibioticima produžava životni vek mutantnih SOD1 miševa (Rothstein et al., 2005). Potvrda izuzetnog značaja ekscitotoksičnosti u patogenezi ALS je i primena riluzola kao selektivnog inhibitora endogenog oslobađanja glutamata, još uvek jedinog priznatog leka koji se primenjuje u terapiji ALS.

### 1.3.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres se javlja zbog poremećaja ravnoteže između procesa proizvodnje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (*eng.* reactive oxygen species, ROS) i mogućnosti sistema da ih eliminiše, popravi oštećenja i vrati sistem u stanje gde su predominantno redukujuća jedinjenja. Ćelijske ROS su proizvod aerobnog metabolizma, koje nastaju uglavnom zbog curenja elektrona iz respiratornog lanca mitohondrija, što dovodi do nekompletne redukcije molekuskog kiseonika za vreme oksidativne fosforilacije i stvaranja superoksidnog anjona i vodonik peroksida (Barber & Shaw, 2010). Superoksid i vodonik peroksid ne spadaju u visoko reaktivne radikale, ali mogu u daljim reakcijama da daju reaktivnije radikale. Superoksid reaguje sa azot oksidom i tom prilikom se stvara peroksinitrit (Beckman & Koppenol, 1996), dok se vodonik peroksid raspada na hidroksidni radikal u Fentonovoj reakciji, a taj proces katalizuje dvovalentni jon gvožđa. Peroksinitrit i hidroksidni radikal su vrlo reaktivni i mogu da oštete proteine, lipide i DNK, što dovodi do menjanja konformacije proteina, narušene dinamike ćelijske membrane usled oksidacije nesaturisanih masnih kiselina i promena u DNK i RNK ćelije. Mnoge patološke studije su dale dokaze o povećanom nivou oksidativnog stresa u post mortem tkivu ALS pacijenata u odnosu na kontrole



(Shaw et al., 1995; Ferrante et al., 1997; Abe et al., 1995; Beal et al., 1997). Markeri lipidne oksidacije su pronađeni u kičmenoj moždini SALS pacijenata, a nisu bili prisutni kod kontrolnih subjekata (Shibata et al., 2001), dok su markeri oksidovane DNK bili povišeni kod SALS pacijenata (Fitzmaurice et al., 1996), sa najznačajnijim povećanjem u ventralnim rogovima (Ferrante et al., 1997). Markeri oksidativnog stresa mogu se registrovati u likvoru ALS pacijenata još u ranim fazama bolesti.

### **1.3.3. Agregacija proteina narušene konformacije**

Prisustvo proteinskih agregata je glavna karakteristika koja je zajednička mnogim neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i ALS (Ross & Poirier, 2005). Kod ALS opisan je veliki broj proteina, koji imaju tendenciju da stvaraju agregate. Najčešći agregati se registruju kao ubikvitinske inkluzije, nazvane po proteinu ubikvitinu koji je prisutan u svim inkluzijama (Wood et al., 2003). Protein koji se najčešće nalazi u ubikvitinskim inkluzijama je TDP43 koji se akumulira u fosforilisanom obliku (Arai et al., 2006). Kod FALS pacijenata sa SOD1 mutacijama, glavni konstituent inkluzija je i mutirana SOD1 (Shibata et al., 1996a; Shibata et al., 1996b; Chou et al., 1996), što je i potvrđeno na modelu transgenog miša (Johnston et al., 2000; Watanabe et al., 2001) kao i u ćelijskim kulturama *in vitro* modela bolesti (Durham et al., 1997; Lee et al., 2002). Proteinski agregati se javljaju neposredno pre ili u vreme pojave simptoma bolesti i njihova koncentracija raste sa progresijom bolesti (Rothstein, 2009).

### **1.3.4. Disfunkcija sekretornog puta**

Kod većine neurodegenerativnih bolesti, uključujući i ALS utvrđena je disfunkcija endoplazmatskog retikulum-asocirani degradativnih (ERAD) mehanizama (Nishitoh et al., 2008). Procenjuje se da je ukupna koncentracija proteina u lumenu ER oko 100 mg/ml, a ovako koncentrovani proteini imaju tendenciju ka formiranju agregata. Različite promene u ćeliji, kao što su abnormalna homeostaza kalcijumovih jona, poremećen redoks status, nedostatak glukoze/energije, ekspresija mutiranih gena ili velika sekretorna aktivnost, mogu da dovedu do zastoja u funkcionisanju ER, što vodi akumulaciji neupakovanih ili pogrešno upakovanih proteina u lumenu ER (Schroder & Kaufman, 2005). Ovakvo stanje se naziva stres ER, za koji se smatra da

doprinosi patogenezi SALS i FALS aktiviranjem pro-apoptotskih mehanizama koji vode ćelijskoj smrti putem apoptoze (Rodrigues et al., 2002; Rojas-Rivera et al., 2010; Schroder & Kaufman, 2005).

Proteazomalni i lizosomalni sistemi predstavljaju dva glavna puta degradacije proteina. Degradacija proteina autofagijom izgleda daje u korelaciji sa sposobnošću proteina da formiraju agregate (Hartl & Hayer-Hartl, 2009). Aktivnost autofagije je povećana kod ALS i ovim putem se otklanjaju proteinski agregati kako mutirane SOD1 tako i “ubikvitiranog” TDP 43 proteina (Wang et al., 2010). Uz to su, kod SALS pacijenata i mutiranih SOD1 miševa, registrovane su povećane količine iRNK za regulatorni protein transporta lizozoma (LYST), inače modulatora egzocitoze i transporta lizozoma što govori u prilog njihove disfunkcije kod ALS (Offen et al., 2009).

### **1.3.5. Disfunkcija mitohondrija**

Patološkim studijama otkrivene su morfološki abnormalne mitohondrije u motornim neuronima ALS pacijenata (Siklos et al., 1996; Sasaki & Iwata, 1996), što je i potvrđeno na modelima *in vitro* i *in vivo*. Zbog neobično velikih zahteva za energijom, motorni neuroni su podložniji kumulativnom oksidativnom stresu nego drugi tipovi ćelija. Frekvencija mutacija mitohondrijalne DNK u motornom korteksu i kičmenoj moždini ALS pacijenata je veća u odnosu na kontrole (Dhaliwal & Grewal, 2000; Wiedemann et al. 2002). Povećano preuzimanje kalcijuma u mitohondrije kao posledica ekscitotoksičnosti izazvane glutamatom može da dovede do generisanja ROS (Carreido et al., 2000). Još jedan od parametara koji može da doprinese disfunkciji mitohondrija je prisustvo mutirane SOD1 (Ferri et al., 2006).

### **1.3.6. Agregacija neurofilamenata i poremećen aksonalni transport**

Neurofilamenti predstavljaju najzastupljeniju vrstu citoskeletnih proteina motornih neurona i igraju važnu ulogu u stimulaciji rasta aksona kao i određivanju njegovog prečnika (Xu et al., 1993). Akumulacija neurofilamenata jeste jedna od karika u lancu poremećaja kod ALS (Hirano et al., 1984). Kod oko 1% SALS pacijenata pronađene su mutacije u genu samo za neurofilament teškog lanca tipa II intermedijarnih neurofilamenata (Tomkins et al., 1998). Mutacije su uočene i u genu za

periferin proteina tipa III grupe intermedijarnih neurofilamenata, već ranije detektovanog u aksonskim agregatima motornih neurona ALS pacijenata (Corbo & Hays, 1992). Motorni neuroni sa aksonima koji mogu da budu dužine do 1 m i iziskuju veoma efikasan unutarćelijski transport (anterogradni, brzi i spori, i retrogradni). Molekularni “motor” anterogradnog transporta je kinezinski kompleks, dok se retrogradni kompleks zasniva na dinaktinu. U aksonima mutantnog SOD1 miša usporena su oba tipa aksonalnog transporta (Williamson & Cleveland, 1999). Identifikovana je tačkasta mutacija u genu za dinaktin u porodici sa autozomalno dominantnom formom bolesti donjeg motoneurona koju karakteriše paraliza glasnih žica (Puls et al., 2003). Mehanizam kojima poremećen aksonski transport može da utiče na smrt neurona još uvek nisu potpuno jasni, ali je izvesno da ima značajnu ulogu u patogenezi ALS (Rothstein, 2009).

### **1.3.7. Deficit neurotrofičkih faktora i disfunkcija signalnih puteva**

Neurotrofički faktori su u fiziološkim uslovima bitni za preživljavanje ćelija na koje deluju preko receptora spregnutih sa enzimom tirozin kinaznog tipa. Signalni putevi koje pokreću neurotrofički faktori inhibiraju ćelijsku smrt, tako da je nedostatak trofičkih faktora jedan od događaja koji može da potpomogne umiranje neurona. Zapaženi su smanjeni nivoi CNTF-a (*eng.* ciliary neurotrophic factor), BDNF-a, GDNT-a i IGF-1 (*eng.* insulin-like growth factor) u post mortem tkivu ALS pacijenata i u *in vitro* modelima ALS (Anand et al., 1995; Elliott & Snider, 1996; Oppenheim, 1996). Takođe, delecija HRE (*eng.* Hypoxia response element) u genu za vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) dovodi do pojave bolesti motornih neurona kod miša (Oosthuyse et al., 2001). Kod ljudi su pronađene tri mutacije u *VEGF* genu koje su asocirane sa predispozicijom za SALS (Lamberechts et al., 2003).

### **1.3.8. Poremećaj metabolizma RNK**

Otkrićem mutacije gena za TDP 43 protein i FUS izmenjenog gena, ALS se pokušava shvatiti kao proteionopatija sa poremećenim metabolizmom RNK. Oba navedena proteina su strukturno slična i pripadaju porodici heterogenih nuklearanih ribonuklearnih proteina (hnRNP) koji učestvuju u metabolizmu RNK na više nivoa. TDP 43 protein svoju ulogu ispoljava u metabolizmu mRNK putem različitih protein-

protein intreakcija, učestvujući i u procesu transporta mRNK iz jedra u citoplazmu te na taj način ostvaruje veoma značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije. S druge strane FUS učestvuje u održavanju genomske stabilnosti, metaboliizmu RNK i u regulaciji transkripcije, obradi pre iRNK i nukleocitoplazmatičnom transportu (mada u manjem stepenu od TDP 43 proteina). Poremećaj na nivou ovih proteina dovodi do brojnih poremećaja na nivou metabolizma RNK i na taj način utiče i na samo preživljavanje motornih neurona (Coyne et al 2017). Značaj oksidativnog oštećenja RNK tokom starenja, koja je registrovana i na ćelijskim modelu ALS i u svim eksperimentalnim modelima bolesti, ponovo se stavlja u epicentar etiopatogeneze bolesti.

### **1.3.9. Inflamacija kao patogenetski mehanizam ALS**

Opšta pojava karakteristična za ALS i druge neurodegenerativne bolesti je inflamatorna reakcija, jer dolazi do aktivacije ćelija glije, uglavnom mikroglije i astrocita, kao i T ćelija imunog sistema. Mikroglija je mezenhimalnog porekla i predstavlja rezidentne makrofage u nervnom sistemu koje konstantno nadgledaju promene u vanćelijskoj sredini i interaguju sa astrocitima i neuronima. Odgovor mikroglije na signale u vanćelijskoj sredini može da bude vrlo različit, ali se njena aktivacija uopšteno karakteriše sekrecijom proinflamatornih faktora kao što su TNF $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor alpha), IFN $\gamma$  (interferon gama) i IL1 $\beta$  (interleukin beta), kao i produkcijom oksidujućih molekula kao što su NO i O $_2$ , koji mogu i da izazovu oštećenja okolnog tkiva. Mikroglija takođe sintetiše i otpušta trofične i antiinflamatorne faktore kao što su IGF-1, IL4 (interleukin 4) i IL10 (interleukin 10), koji potpomažu reparativne procese i ograničavaju inflamaciju. Astrociti su ektodermalnog porekla, vrlo su brojni u mozgu i po prirodi nisu imunske ćelije, ali u specifičnim uslovima mogu da doprinesu imunskom odgovoru (Farina et al., 2007). Jedna od glavnih karakteristika je aktivacija mikroglije i astrocita i pojava limfocita u moždanom tkivu ALS pacijenata i u kičmenoj moždini što je evidentirano u mnogim post mortem i eksperimentalnim studijama (Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001; Nagy et al., 1994). Svi rezultati govore da je neuroinflamatorna reakcija u ALS trajnog karaktera. Smatra se, da je u FALS taj faktor sam mutirani protein. Aktivacija imunog odgovora, koja u početku ima zaštitnu funkciju, zbog nesposobnosti inflamatorne reakcije da ukloni potencijalno opasan uzrok, prerasta u štetni proces koji doprinosi daljem oštećenju neurona (Philips

& Robberecht, 2011). Takođe sa otkrićem mutacije u genu za c9orf72 došlo se da spoznaje da su mehanizmi imunske aktivacije u patogenezi ALS slični mehanizmima imunske aktivacije kod multiple skleroze. Ovi mehanizmi mogu povećati penetrantnost same genske promene i uticati na progresiju bolesti ALS pacijenta sa opisanom mutacijom, ali i sugerišu i u pravcu nove terapijske strategije kod ALS pacijenata u čijoj osnovi se nalazi ovakva specifičnost.

### **1.3.10. Apoptoza**

Smatra se da finalni proces smrti motoneurona ALS liči na programiranu ćelijsku smrt (apoptozu). Biohemijski markeri apoptoze mogu se detektovati u terminalnim fazama kod ljudi i animalnih modela ALS (Guegan & Przedborski, 2003; Li et al., 2000; Vukosavic et al., 1999). Ključni elementi normalnog apoptotskog puta, koji su uključeni i u ćelijsku smrt u ALS obuhvataju kaspaznu familiju proteolitičkih enzima, Bcl2 familiju onkoproteina i familiju proteina inhibitora apoptoze (Shaw, 2005; Sathasivam et al., 2001; Pasinelli & Brown, 2006).

Zbirno gledano etiopatogenezu bolesti možemo didaktički da podelimo u tri faze. Prvu fazu (ili ranu fazu) razvoja bolesti determinisali bi različiti genetski činioci koji utiču na razvoj i karakteristike arhitektonike motornog sistema, koji kasnije u životu mogu predstavljati *locus minoris* za patološke promene pod uticajem različitih faktora spoljašnje sredine. Tako indukovani brojni molekularni patološki mehanizmi koji utiču jedni na druge oštećuju motorne, ali i nemotorne neurone, makro i mikroglijane ćelije, sa konsekvntivnim poremećenim ćelijskim metabolizmom. Ove promene dovode do akumulacije toksičnih agregata različite strukture, koji kao krajnji ishod imaju prevremenu smrt ćelije kroz mehanizme apoptoze i autofagije. Druga faza predstavlja fazu dekompenzacije svih zaštitnih mehanizama koji su do tada štitili "napadnute" neuralne strukture i putem opisanih mehanizama glijalne aktivacije, ekscitotoksičnosti i oksidativnog stresa, kao i poremećenog metabolizma RNK, dovele do kliničke ekspresije bolesti. Treća faza je fenotipska varijabilnost ispoljavanja bolesti na bazi svih mogućih interakcija opisanih patoloških mehanizama koji su doveli do stvaranja različitih patoloških inkluzija, i koja se predstavlja u različitom stepenu oštećenja motornih, ali i nemotornih neurona. Takav scenario objašnjava mogućnost ispoljavanja bolesti na vrlo heterogen način -kao sporodična klasična ALS, fenotipske subforme

bolesti motornog neurona kao što su PMA i PLS, genetski determinisane ili familijarne ALS, ALS-FTD kompleks bolesti, ili pak čiste FTD na kraju spektra patohistološko-genetskih interakcija.

#### **1.4. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE ALS**

U *post mortem* studijama tkiva pacijanta obolelih od ALS najznačajnije patohistološke promene su dokazane na nivou motornih neurona lamine V Brodmannove zone 4 i u motornim neuronima Rexedove lamine IX prednjih rogova kičmene moždine. Wallerova/ aksonska degeneracija projekcionih vlakana piramidnih neurona uočena je u centrumu semiovale, crus posterior capsule interne, crura cerebri, bazi ponsa, piramida medule i lateralnih kolumni kičmene moždine. Vrlo sličan proces aksonalne degeneracije odigrava se i u projekciji spinalnih motornih neurona i obuhvata prednje korenove, motorna vlakna perifernih nerava sa posledičnom denervacijom mišića i amiotrofijom. Osim toga, kod ALS su na svim nivoima CNS-a uočene su astroglioza, spongioza i mikroglijalna aktivacija. U mozgu je astroglioza detektovana i u sivoj i u beloj masi i prevazilazi granice motornog korteksa (Kushner et al., 1991), dok je kičmenoj moždini pacijenata prisutna, kako u ventralnim, tako i u dorzalnim rogovima, kao i na mestima gde vlakna kortikospinalnog trakta ulaze u sivu masu (Schiffer et al., 1996). Mikroglioza je zapažena u motornom korteksu, motornim jedrima moždanog stabla, duž kortikospinalnog trakta i u ventralnim rogovima kičmene moždine (Kawamata et al., 1992). Sve ove studije daju informaciju o stanju u finalnoj fazi bolesti. Takođe je uočena i asimetrija zahvaćenosti određenih regiona, što odgovara i najčešće asimetričnom početku kliničkog ispoljavanja bolesti. Smatralo se da su neuroni Onufovog jedra kičmene moždine kao i jedra okulogirnih nerava u moždanom stablu pošteđeni patohistološkog procesa u sklopu ALS, međutim sa dužim preživljavanjem obolelih, pre svega sa ventilatornom podrškom, verifikovane su promene i u neuronima ovih jedara. Osim primarnog motornog oštećenja zahvaćene su i druge CNS strukture, kao što su hipokampus i delovi senzornog korteksa, što opravdava današnje shvatanje ALS kao multisistemske bolesti. Povećana imunoreaktivnost na ubikvitin potvrđena je patohistološki u postmortem studijama SALS i FALS pacijenata (Bruijn et al., 1998; Howland et al., 2002). Rezultati imunohistohemijskih ispitivanja ukazuju da kod više od 90% ALS pacijenata postoje

citotoksične citoplazmatske inkluzije koje sadrže TDP 43 kao osnovni konstituent ubikvitinskih inkluzija. Kod ALS, TDP43 se akumulira u fosforilisanom obliku sa fragmentima u vidu slabo rastvorljivih inkluzija, dominantno u citoplazmi od frontotemporalnog korteksa, preko hipokampusu, do prednjih rogova kičmene moždine i ćelijama glije. Abnormalni ubikvitinski agregati TDP43 prisutni su nezavisno od fenotipa tj. kod PLS i PMA, kod oko 50% FTD pacijenata kao i kod familijarne ALS osim kod pacijenata nosioca SOD1 i FUS mutacija. Pored ubikvitinskih inkluzija, kod ALS uočene su i promene tipa: sferoida, koji predstavljaju velike, do 20 mikrometara u prečniku, eozinofilne inkluzije koje sadrže neurofilamente. Karakteristične su u patohistološkim nalazima kod FALS SOD1 pozitivnih pacijenata. Bunina telešca su male, prečnika od 2-6 mikrometara, eozinofilne inkluzije koje predstavljaju granulirane akumulacije lipofuscina u alfa motornim neuronima prednjih rogova kičmene moždine. Takođe, “Lewy body like hyaline inclusions“ eozinofilnog tipa bojenja predstavljaju takođe karakterističan nalaz akumulacije ubikvitina koje u manjoj meri sadrže i neurofilamente proteine (češće se sreću kod genetski determinisanih formi bolesti). Na osnovu kliničke slike na početku bolesti nemoguće je razlikovati sporadične od familijarnih oblika bolesti. Međutim, na osnovu patohistološkog nalaza u nekim slučajevima razlike su evidentne. Degeneracija neurona na nivou zadnjih funikula, na nivou Clarkovog jedra, kao i u nivou spinocerebelarenih puteva je znatno češća kod FALS pacijenta ( što se i potvrđuje prisutvom tzv. “atipičnih“ znakova kod FALS, kao što su oštećenje senzibiliteta, postojanje ataksije i drugo). Opisane patohistološke promene su u saglasnosti sa genetskom intra i interfamilijarnom heterogenošću. Obolele od FALS sa mutacijom A4V u SOD1 genu, karakteriše brza progresija sa kratkim trajanjem bolesti. Kod ovih pacijenata postmortem studije ukazale su na izražene znake oštećenja posteriornih kolumni uz prisutvo intracitoplazmatskih inkluzija sa intenzivnom SOD1 imunoreaktivnošću na nivou mikroglije (Schmidlin et al, 2009). U korelaciji sa kliničkom prezentacijom dominantne afekcije DMN, uočene su i neznatne promene aksona kortikospinalnog (centralnog) puta. Elektronskom mikroskopijom preparata kod SOD1 FALS verifikovana je u visokom stepenu vakuolarna degeneracija na nivou mitohondrija, što potvrđuje ranije opisanu činjenicu da je ulazak mutirane SOD1 u mitohondrije možda i primarni molekularni događaj koji predstavlja okidač dalje progresije bolesti i degeneracije neurona. Pored oštećenja samog aksona neurona,

kod ALS je verifikovano i oštećenje mijelina i gliozna kortikospinalnih posebno lateralnih puteva.

## **1.5. EPIDEMIOLOGIJA ALS**

Epidemiološke studije širom sveta potvrđuju da se ALS kao sporadična bolest najčešće javlja između 55. i 65. godina života, sa nešto većom učestalošću kod muškaraca (1.3-1.5:1) (Talbot et al., 2016). Učestalost kod osoba ženskog pola se povećava posle sedme decenije, sa većom učestalošću bulbarnog početka bolesti (kod oko 40% obolelih pacijentkinja). ALS može da počne i pre 30 godine života, tzv. ALS ranog početka, sa epidemiološkom slikom češćeg oboljevanja kod pacijenata muškog pola, sa dominantno spinalnim početkom bolesti ( kod svega 15% ALS ranog početka javlja se bulbarni početak bolesti). Juvenilna ALS se karakteriše početkom bolesti do 25.godine života (Aggarwal A et Shashiraj, 2006), izuzetno retko je sporadična, najčešće familijarna u sklopu mutacija gena alsin (ALS 2) i senetaksin (ALS4). Familijarno ispoljvanje bolesti se javlja kod 5-10% obolelih i početak bolesti je po pravilu raniji (oko deset godina ranije u odnosu na sporadičnu formu bolesti), bez razlike između muškaraca i žena. Poslednji epidemiološki podaci iz Srbije govore da je početak ALS u našoj populaciji najčešće oko 57. godine života, nešto ranije kod muškaraca, i sa predominacijom muškog pola u odnosu skoro 1.5:1 (Stevic et al. 2016). Prosečna godišnja incidencija ALS u svetu iznosi 1.5-2.7/100000. Međutim, opisana su područja u svetu sa izrazito višom incidencijom bolesti kao što su ostrvo Guam, ostrvo Kii u Japanu, Nova Gvineja, Indonezija, Severna Australija, Guadalupe, južna Dakota u SAD. Rizik da jedna osoba posle 60. godine života oboli od Parkinsonove bolesti je 1:100, dok kod ALS taj rizik odnosi 1:400-1:1000 (Uccelli et al., 2007). Uočene su i neke etničke razlike pojave ALS, tako da se bolest retko javlja u Africi, nekim delovima Azije, kod romske populacije, kao i da je npr. u ostrvskim američkim zemljama poput Kube. Kod ovih etničkih grupa zapažena je raniji početak bolesti u odnosu na svetski prosek, ali je opisano i duže trajanje bolesti. Prevalencija bolesti u svetu iznosi od 2.7-7.4/100.000 stanovnika. Najveća do sada registrovana incidencija bolesti u Srbiji registrovana je 2000. godine 1.88/100000 stanovnika, a prosečna incidencija po poslednjim epidemiološkim studijama za teritoriju Grada Beograda je iznosila



1.1/100.000 stanovnika. Prosečna stopa mortaliteta iznosi 1.5-2.5/100.000 godišnje, sa prosečnom dužinom trajanja bolesti između 26-43 meseci. U poslednjih deset godina verifikovano je nešto duže preživljavanje pacijenata sa ALS od 4.43 (medijana 3 godine) godine, verovatno zahvaljujući savremenoj mogućnosti primene neinvazivne ventilacije u kućnim uslovima, i drugim suportativnim metodama lečenja. Zbog izražene heterogenosti, epidemiološke studije familijalnog oblika bolesti nedostaju, ali se kod pojedinih tipova FALS bolesti na osnovu fenotipskih karakteristika može posumnjati na određene genetske mutacije. Srednje životno doba, na početku, kod FALS iznosi 46 godina (24-72) (Byrne S at al. 2011), a prosečna dužina trajanja bolesti je slična kao i kod SALS, iako su registrovane genetski determinisane forme bolesti sa kraćim (od oko 1-2 godine) ili dužim preživljavanjem (od 7-20 godina).

## **1.6. KLINIČKA SLIKA ALS**

Osnova kliničke prezentacije ALS podrazumeva progresivnu slabost mišića uzrokovanu degeneracijom gornjeg (nivo kore velikog mozga, kortikospinalni i kortikobulbarni putevi) i donjeg (jedra kranijalnih nerava u moždanom stablu i alfa motornih neurona prednjih rogova kičmene moždina). Klinički se oštećenja prezentuju znacima oštećenja GMN i DMN u jednom ili više regiona tela (kranijalni, cervikalni, torakalni i lumbosakralni). Međutim, zbog velike heterogenosti i stepena kliničkog ispoljavanja znakova oštećenja GMN i /ili DMN, ostaje dilema da li je ALS jedna bolest ili ALS sindrom. Zbog različitog stepena afekcije GMN i DMN u pojedinim regionima tela, disfunkcije i drugih moždanih struktura koje uslovljavaju izmene kognitivnog i bihevioralnog, statusa, kao i brzina progresije bolesti definisani su različiti klinički podtipovi bolesti. Važno je naglasiti da iako je ostvaren izuzetan napredak u rasvetljavanju etiopatogeneze, postoji čak velika varijabilnost i kod dobro definisanih kliničkih entiteta kako kod SALS tako i FALS pacijenata. Sa druge strane između sporadične ALS (SALS), prisutne kod 90%, i familijarne ALS (FALS) kod 5-10% obolelih, u suštini nema bitne razlike u fenotipu, na početku bolesti. Mnogi različiti genotipovi mogu imati identične ili barem vrlo slične kliničke fenotipove. Ova činjenica govori u prilogu hipoteze polietiopatogenetskih mehanizama nastanka bolesti motornog neurona. Nasuprot tome, evidentno je da jedan genotip (ista genska mutacija)

uzrokuje više različitih inter i intrafamilijarnih fenotipova što sugeriraju da jedan mehanizam (ili proteinska promena) može dovesti do ispoljavanja više fenotipova. Mehanizmi nastanka bolesti očigledno i konvergiraju i razilaze se.

### **1.6.1. Fenotipska klasifikacija ALS**

#### **A) Podela na osnovu stepena oštećenja gornjeg i donjeg motornog neurona (GMN i DMN)**

1. Tipična ALS- karakteriše se pojavom znakova oštećenja GMN i DMN u jednom segmentu tela ("fokalni" početak) sa progresijom i zahvatanjem ostalih regiona tela. Bolest može početi na nivou gornjih ili donjih ekstremiteta (spinalni početak bolesti) ili na nivou centralnih struktura odgovornih za govor i gutanje (bulbarni početak bolesti). Retko bolest počinje zahvatanjem mišića trupa i respiratorne muskulature (manje od 3% svih obolelih), a retko znacima frontotemporalne demencije.
2. Primarna lateralna skleroza (PLS) se registruje u 1-4% pacijenata sa BMN i karakteriše znacima lezije samo GMN. Bolest u više od polovine slučajeva počinje na donjim ekstremitetima i tokom vremena ima ascedentno tok ka gornjim ekstremitetima i bulbarnoj muskulaturi. Kod ovih pacijenata registruje se raniji početak bolesti u odnosu na tipičnu ALS, bez polne predominacije. Na početku može postojati asimetrija u nalazu na gornjim i donjim ekstremitetima. Srednja dužina trajanja bolesti je više od 14 godine (Floter and al 2009). Postoje tri opisane subtipa PLS: PLS-A ascedentna forma, PLS-M multifokalni početak bolesti, i PLS-SP sporadična spastična parapareza. Elektromiografski (EMNG) uredan nalaz sugeriraju zahvaćenost samo GMN, i može biti prediktor prognoze bolesti: naime, pacijenti sa PLS nakon 3-4 godine od inicijalnih simptoma bolesti koji i dalje imaju „negativan“ EMNG nalaz (bez znakova i minorne aktivne afekcije DMN), imaju dugoročno preživljavanje, dok pacijenti kod kojih se na EMNG pregledu pojave znaci aktuelnog oštećenja DMN imaju lošiju prognozu, sličnu kao i pacijenti sa tipičnom slikom ALS, sa dominacijom znakova oštećenja GMN. Ovo objašnjenje sugeriraju da dijagnoza PLS može biti definisana tek nakon 4 godine trajanja bolesti i isključivanjem drugih diferencijalno dijagnostičkih entiteta lezije GMN (hereditarna spastična

parapareza, primarno progresivna multipla skleroza i drugo). FTD i druge kognitivne promene se mogu javiti i kod pacijenata sa PLS, ali znatno ređe.

3. Progresivna mišićna atrofija (PMA) se javlja kod oko 2.5% svih odraslih obolelih od BMN (Kim et al.,2009) i karakteriše se znacima oštećenja DMN. Najčešće se javlja kod pacijenta muškog pola i u kasnijem životnom dobu (nakon 60. godine života). Kod 70% PMA pacijenta, u okviru 3-4 godine od početka simptoma, dolazi do upotpunjavanja kliničke slike tipične ALS. Uopšteno ovi pacijenti žive u proseku duže za 1-3 godine od tipičnih ALS pacijenata. I kod pacijenata sa PMA mogu se ispoljiti znaci kognitivne disfunkcije. Nije uočeno postojanje korelacije između stepena kognitivnog oštećenja i kliničkih znakova oštećenja DMN. Rezultati ispitivanja centralne motorne provodljivosti (transkranijalnom magnetnom stimulacijom- TMS) ukazali su na znake centralne afekcije kod više od polovine pacijenata sa kliničkom prezentacijom PMA. U Severnoj Americi SOD1 A4V mutacija se determiniše kao PMA fudrojantnog toka, jer je preživljavanje svega godinu dana od početka simptoma bolesti.
4. Progresivna bulbarna paraliza (PBP) čini oko 1-2.5% svih SALS pacijenata, sa predominacijom ženskog pola i početkom u poznijim godinama života. Dominiraju znaci bulbarne paraliza sa disfagijom i dizartrijom, a u oko polovine obolelih se mogu javiti znaci pseudobulbarne paralize, depresija i retko FTD. Konverzija u klasičnu bolest motornog neurona je gotovo sigurna nakon 12 meseci trajanja bolesti, a prosečno preživljavanje je između 35-45 meseci.

B) Podela na osnovu tipa početka bolesti, tj. znakova oštećenja određenog regiona/segmenta

1. Bulbarni početak ALS se javlja kod oko 25% obolelih i karakteriše se afekcijom GMN i/ili DMN u kranio-cervikalnom regionu (nivo mišića inrevisanih kranijalnim nervima zaduženih za žvakanje, gutanje, govor i snagu mišića vrata i jezika- bulbarna i/ili pseudobulbarna paraliza). Postojanje znakova oštećenja DMN na EMNG pregledu (fibrilacije, fascikualcije) u ispitanim mišićima, ne sugeriše bolju ili lošiju prognozu bolesti. Karakteristična je predominacija ženskog pola sa porastom incidencije nakon 70 godina. U literaturi uz bulbarni

početak ALS-a se češće opisuju afektivne (pseudobulbarni afekat, emotivna inkontinencija), kognitivne promene kao i pojava depresije kao komorbiditeta (Ferguson et al 2007).

2. Početak na gornjim i/ili donjim ekstremitetima se javlja kod 75% obolelih pacijenata („spinalni“ početak bolesti). Međutim, pored klasične (tipične) forme bolesti kod koje postoje znaci oštećenja GMN i DMN u jednom segmentu tela sa postepenim i vremenski definisanim širanjem, postoje i tzv. „regionalne“ varijante bolesti koje se karakterišu početkom u tačno definisanom segmentu tela i prominentnim znacima oštećenja DMN (Jawdat et al 2015). To su:

- a) „Flail arms“ sindrom (Vulpian-Bernhardt sindrom, sindrom visećih ruku, sindrom čoveka u buretu, brahijalna amiotrofična diplegija) (FA). Ovaj fenotip opisao je Vulpian 1886. kao sindrom proksimalne slabosti i hipotrofije mišića gornjih ekstremiteta („skapulohumeralna varijanta progresivne mišićne atrofije“). Sindrom se najčešće prezentuje progresivnom simetričnom, dominatno proksimalnom, slabošću i hipotrofijom mišića gornjih ekstremiteta koje je često i bez značajnog funkcionalnog zahvatanja donjih ekstremiteta ili bulbarne muskulature na početku bolesti. U daljem toku bolesti dolazi do plegije i globalne hipotrofije do atrofije mišića ruku. Češće se ispoljava kod pacijenata muškog pola (4:1), sa nešto većom dužinom trajanja bolesti (60 meseci) u odnosu na tipičnu ALS, i čini ukupno oko 11% svih SALS pacijenata. Kod većine ovih pacijenata (27-77%) sa progresijom bolesti EMG pregledom registruju se znaci afekcije DMN na donjim ekstremitetima i bulbarna slabost. Da bi potvrdili postojanje ove varijante ALS-a Katz et al. (1999) naveli su kao vremenski kriterijum osamneastomesečni period slabosti koja je lokalizovana samo u datom regionu bez znakova afekcije GMN. Na osnovu Wijeskera kriterijuma (Wijeskara et al. 2009) FA sindrom se definiše ukoliko slabost na rukama izolovano postoji 12 meseci i po ovim kriterijumima pacijenti su mogli imati znake afekcije GMN. U studiji Katz et al. (1999), nakon prosečnog praćenja od 5,5 godina, slabost do plegije je ostala ograničena na gornje ekstremitete kod 7 od 19 (nešto manje od 50%) pacijenata.. Patohistološke studije su ukazale na gubitak i degeneraciju alfa motornih neurona u prednjim rogovima kičmene moždine s Bunina-im telašcima, ubikvitin-pozitivnim

fibrilima nalik Lewy-jevim telima, kao i na inkluzije u motornim neuronima tipičnim za ALS.

b) „Flail legs“ (FL) sindrom je prvi put prepoznat od strane Pierre Marie, a opisao ga je njegov učenik Patrikios i poznat je još i kao pseudopolineuritna varijanta ALS-a, Marie-Patrikios ili „peronealna“ ALS. Marie i Patrikios (1918. godine) su opisali sindrom asimetrične distalne (pre svega peronealne) mišićne slabosti, s odsutnim mišićnim refleksima, sporog napredovanja, sa kasno prisutnim pridruženim znacima oštećenja GMN. Javlja se kod 3-3,5% svih SALS pacijenata, nešto češće kod pacijenta muškog pola, ali bez jasne polne razlike kao kod FA sindroma. Fokalan nalaz na donjim ekstremitetima se može održavati između 18-24 meseci. Studije su pokazale da je mediana preživljavanja u ovoj formi bolesti od 76-96 meseci. Studije centralne provodljivosti pokazuju patološki nalaz uprkos odsustvu kliničkih znakova oštećenja GMN. Za razliku od ostalih ALS pacijenata, patohistološke studije kod FL sindroma ukazale su na opsežan gubitak mijelinizovanih vlakana u lateralnom kortikospinalnom traktu torakalnog i lumbosakralnog dela kičmene moždine.

c) Hemiplegična ALS (Mills-ova varijanta) predstavlja osporenu i retku varijantu ALS-a koja se karakteriše progresivnim hemiplegičnim obrascem ispoljavanja- od motornog ascedentnog/descendentnog deficita koji se ascedentno širi iz noge ili descendentno iz ruke. Ovaj varijetet bi mogao predstavljati podtip PLS, s obzirom da dominiraju znaci oštećenja GMN. Pozitronska emisiona tomografska (PET) studija u jednom opisanom prikazu pacijenta ukazala je na upečatljivu mikrogljalnu aktivaciju u kontralateralnoj hemisferi.

### C) Podela na osnovu zahvaćenosti nemotornih regiona:

#### 1. Frontotemporalna demencija (FTD)

Kod 15% FTD i 30% ALS pacijenta postoji tzv.sindrom kliničko-patološkog preklapanja („overlap“ syndrome) ALS i FTD . Glavna odrednica

FTD su promene u levom ili desnom frontalnom i/ili temporalnom režnju. Na osnovu neuropatoloških ispitivanja FTD, opisuju se tri glavna podtipa bolesti: FTD-U ili TDP-43 pozitivna FTD (oko 50% pacijenata), FTD-tau pozitivna demencija (oko 40-50% pacijenata), te FTD-FUS (oko 3-5% pacijenata). FTD-U i FTD-FUS pokazuju značajno patoanatomsko preklapanja sa ALS, što nije slučaj sa FTD-tau. U ovom trenutku postoje samo pojedinačni opisi udruženosti FTD-tau i ALS. Pored patohistološkog preklapanja, dokazano je i genetsko preklapanje između ALS i FTD u vidu ekspanzije heksanukleotidnih ponovaka GGGGCC na 9. hromozomu (c9orf72). Opsežne studije tokom poslednjih nekoliko godina su pokušale da determinišu korelacije između FTD kliničkih fenotipova sa FTD neuropatološkim i genetskim podtipovima, međutim prediktori i korelacije između kliničkog i neuropatološko/genetskog supseta su i dalje nejasni i složeni. Kao i ALS, FTD se može posmatrati kao bolest fokalnog početka sa tendencijom širenja.

## 2. Druga ispoljavanja u ALS osim oštećenja viših kortikalnih funkcija

Osim demencije, postoje različite atipične centralne manifestacije koje mogu biti u sklopu ALS i definišu se kao entitet koji se naziva "ALS-plus sindrom". Moguća je pojava ekstrapiramidnih motornih znakova, supranuklearne paralize pogleda, kao i zahvaćenost autonomnog nervnog sistema. Različite manifestacije kao što su poremećaj energetskeg metabolizma uključujući gubitak telesne težine, hipermetabolizam i hiperlipidemija impliciraju da i drugi delovi CNS (npr. hipotalamus) mogu biti uključeni u patogenezu ALS. Na osnovu brojnih istraživanja možemo reći da postoji dovoljno kliničkih, neuropatoloških i neuroradioloških dokaza koji ukazuju na mogućnost zajedničkog neuropatološkog supstrata u okviru spektra ALS/BMN, tako da je „atipičnost“ pojave plus znakova krajnje arbitrarna.

## 1.7. DIJAGNOZA ALS

Dijagnoza ALS je primarno zasnovana na kliničkoj slici, prisutnosti znakova oštećenja gornjeg i donjeg motornog neurona u istom regionu tela. U tu svrhu još davnih dana je konstituisan tzv. Charcot-ov trijas: atrofija i slabost mišića ruke (šake i podlaktice), generalizovana hiperefleksija i povišen tonus na donjim ekstremitetima. Danas se postavlja pitanje: da li je ovaj trijas dovoljan za postavljanje dijagnoze ALS? Ovakvo kliničko ispoljavanje mogu imati i druge neurološke bolesti, a osnovni cilj je postaviti dijagnozu ALS što pre s obzirom da se radi o progresivnom degenerativnom oboljenju. U cilju potvrde prisutnosti znakova oštećenja GMN i DMN, razvijeni su dijagnostički instrumenti i kriterijumi koji bi dijagnozu ALS podržali i potvrdili. U tu svrhu primarno mesto među dijagnostičkim procedurama zauzima EMNG sa primenom standardnih tehnika kojima se verifikuje oštećenje donjeg motornog neurona registrovanjem znakova aktuelne (fibrilacije, fascikulacije, miokimije, pozitivni denervacioni potencijali) i hronične neurogene lezije (smanjena regrutacija motornih jedinica, motorni potencijali uvećane amplitude, produženog trajanja i polifaznog izbijanja). Pored EMNG, u savremenom konceptu neurofiziologije BMN, koriste se i kvantitativne tehnika ispitivanja koje nisu standardne niti kriterijumski definisane kao što su: analiza gustine vlakana, makro EMG, turnes/amplitude analiza, multi MUP analiza i motor unite number estimation (MUNE) (Bromberg 2013). Kod ALS-a elektroneurografija je najčešće uredna posebno na senzitivnim neravima, a na motornim nervima, sa trajanjem bolesti mogu se uočiti određene promene koje se pre svega odnose na sniženu amplitudu motornog evociranog potencijala, i sekundarno sniženu brzinu koja uvek mora da bude iznad 75% od donje granice referentne vrednosti, kao i minimalna latenca F talasa koja mora biti manja od 130% od gornje granice referentne vrednosti. Terminalna latenca i trajanje distalnog motornog evociranog potencijala moraju biti manji od 150% u odnosu na referentne vrednosti. Kod ALS pacijenata ne registruju se kondukcion blokovi provođenja (koji bi u slučaju prisutnosti sugerisali moguću multifokalnu motornu neuropatiju (MMN) i/ili hroničnu demijelinizirajuću poliradikuloneuropatiju (CIDP), kao ni patološka temporalna disperzija (koja bi mogla sugerisati CIDP). Takođe, kod ALS pacijenata se može sresti pozitivan test neuromišićne transmisije sa dekrementom do 20%, kao i pozitivan nalaz single fiber EMG (SFEMG), kao znak lezije perifernog motornog neurona (de Carvalho et al 2013).

Radna grupa Svetske federacije za neurologiju je 1990. godine definisala dijagnostičke kriterijume za ALS (El Escorial kriterijumi objavljeni 1994.godine) (Brooks 1994), koji su prvi put revidirani 1998. godine (Airlie House kriterijumi objavljeni 2000. godine) (Brooks et al 2000, Traynor et al 2000). I pored revizije, na osnovu El Escorial kriterijuma, 10-22% pacijenata nikada tokom života ne može da zadovolji tražene kriterijume za "definitivnu" formu ALS-a, dok 56% pacijenta nikada ne može da ispunji kriterijume za "definitivnu" i "verovatnu" formu bolesti. Dijagnostičko kašnjenje nakon uvođenja El Escorial kriterijuma bilo je u proseku godinu dana za sve forme bolesti, nešto kraće kod pacijenata sa bulbarnim (9 meseci u proseku), u odnosu na one sa spinalnim početkom bolesti (16-18 meseci). U ovim kriterijumima nije bilo mogućnosti spoznaje stepena zahvaćenosti GMN, kao ni mogućnosti potvrde dijagnoze kod pacijenta koji u dugom toku bolesti nisu razvili znake GMN, a koji su klinički jasno razvili sliku ALS, te su konstituisani tzv. Awaji kriterijumi (Carvalho et al 2009), čime je omogućeno obuhvatanje i ovih pacijenata pod definicijom „definitivne“ ALS. Ovi kriterijumi su izjednačili značaj elektrofizioloških i kliničkih promena u dijagnostici bolesti i prvi put definisali pojavu neurofizioloških fascikualcija kao ekvivalent „aktuelne, neurogene lezije (ekvivalent fibrilacijama i pozitivnim oštrim talasima kao obrazac procene progresije denervacije) na već prisutno hroničnom neurogenom obrascu registrovanja. Sa kombinacijom revidiranih El Escorial i Awaji kriterijuma postignuti su sledeći ciljevi: pri prvom pregledu dijagnoza ALS se postvalja prema Awaji kriterijumima kod 94% obolelih, a prema revidiranim El Escorial kriterijumima kod 40% obolelih; senzitivnost kod ALS sa bulbarnim početkom na osnovu sadašnjih kriterijuma raste sa 37 na 87%, dijagnostička senzitivnost napravljenih kriterijuma danas povećava senzitivnost „definitivnosti“ dijagnoze na 95%, a „mogućnosti“ dijagnoze raste sa 50 na 87%.

Na osnovu ovih tzv. El Escorial i El Escorial modifikovanih i Awaji kriterijuma, ALS se dijagnostički danas klasifikuje u četiri osnovne kategorije bolesti (Tabela 2 i 3):

- Klinički definitivna ALS,
- Klinički definitivna, laboratorijski potvrđena ALS,
- Klinički verovatna ALS,
- Klinički moguća ALS.



Tabela 2. Dijagnostički kriterijumi za ALS (revidirani El Escorial i Awaji neurofiziološki kriterijumi) prema Brooks et al.2000, de Carvalho et al 2009.

Klasifikacione kategorije dijagnostičke sigurnosti bazirane na kliničkim nalazima	
<b>Klinički definitivna ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN* i DMN** ili elektrofiziološki pokazatelji u najmanje 3 ispitana regiona***</li> </ul>
<b>Klinički definitivna, laboratorijski potvrđena ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN i/ili DMN u jednom ispitanom regionu i detektovana patogena mutacija u SOD1 genu</li> </ul>
<b>Klinički verovatna ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN i DMN ili elektrofiziološki pokazatelji znakova oštećenja DMN u 2 ispitana regiona sa barem jednim znakom oštećenja GMN rostralno u odnosu na kliničke znake oštećenja GMN</li> </ul>
<b>Klinički moguća ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN i DMN ili elektrofiziološki pokazatelji u 1 zajedničkom regionu ili</li> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN u barem 2 ispitana regiona ili</li> <li>• Klinički znaci oštećenja GMN i DMN u 2 regiona bez znakova oštećenja GMN rostralno u odnosu na znakove oštećenja DMN</li> </ul>

\*Znaci oštećenja GMN: hipertonijska po spastičnom tipu, klonus, pozitivna znak Babinskog, ugašeni kožni trbušni refleks, pojačani patološki mišićni refleksi

\*\*Znaci oštećenja DMN: hipo i /ili atrofijska mišića, slabost, fascikulacije, znaci aktuelne neurogene lezije potvrđena EMG pregledom (u najmanje 2 mišića istog regiona na rukama i nogama, a u jednom regionu u kranijalnom i torakalnom segmentu, inervisanih od strane različitog nerva i korena da bi taj region bio označen kao definitivno, moguće ili verovatno zahvatanje)

\*\*\*Ispitani region: kranijalni (bulbarni), cervikalni (ruke), torakalni (paraspinalna muskulatura ili m.rectus abdominis) i lumbosakralni (noge)

Tabela 3. Dijagnostički kriterijumi za ALS

<b>Kriterijumi neophodni za dijagnozu ALS (“pozitivni” kriterijumi)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Znaci oštećenja DMN evidentirani klinički, elektrofiziološki i neuropatološki</li> <li>✓ Klinički znaci oštećenja GMN</li> <li>✓ Progresija simptoma ili znakova bolesti u okviru jednog ili drugih regiona, evidentirana anamnestički ili kliničkim pregledom</li> </ul>
<b>Kriterijumi koji mogu isključiti dijagnozu ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Senzitivni ispadi</li> <li>✓ Sfinkterijalne smetnje</li> <li>✓ Poremećaji vida</li> <li>✓ Autonomna disfunkcija</li> <li>✓ Ekstrapiramidna simptomatologija</li> <li>✓ Alzheimerova demencija</li> <li>✓ Sindromi koji imitiraju ALS (“mimics”)</li> </ul>
<b>Podržavajući kriterijumi za ALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Fascikulacije u jednom ili više regiona tela</li> <li>✓ Neurogeni obrazac u EMG ispitivanju</li> <li>✓ Normalan senzitivni neurogram na ENG</li> <li>✓ Odsustvo konduccionog bloka provođenja</li> </ul>

### 1.7.1. Dijagnoza FALS

Do danas ne postoji zvanični konsenzus oko definicije FALS. Klinički se pacijenti sa FALS i SALS ne mogu razlikovati na početku bolesti. Danas je prihvaćeno da se ALS nazove familijarnom ukoliko je jedan ili više srodnika prvog ili drugog stepena srodnosti oboleo od bolesti motornog neurona sa verifikovanom genskom promenom. Zbog nedostataka definisanih kriterijuma, još uvek ne postoje globalno prikazani epidemiološki podaci o FALS. Učestalost FALS u određenim populacijama zasnovana je na postojanju detaljnih anamnestičkih podataka o porodičnoj pojavi bolesti, mada postoje brojni faktori koji ovakvim ispitivanjem mogu doprineti lažno pozitivnom ili lažno negativnom determinisanju bolesti kao familijarne subforme bolesti (Tabela 4)

Tabela 4. Faktori koji doprinose lažno pozitivnom ili lažno negativnom determinisanju familijarne ALS

Lažno negativna determinacija FALS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nedostak informacija iz prethodnih generacija o oboljenju</li> <li>• Kod pacijenta je <i>de novo</i> verifikovana mutacija, nije održan kontinuitet obaveštavanja nadležnih medicinskih službi o sledećem obolelom u istoj porodici</li> <li>• Pogrešna dijagnoza sledećeg obolelog člana porodice</li> <li>• Rođaci koji su ranije preminuli</li> <li>• Mala genetska penetrantnost i/ili malobrojna porodica koja doprinosi da se familijarni oblik bolesti ispoljava kao sporadični</li> <li>• Kašnjenje u dijagnozi</li> </ul>
Lažno pozitivna determinacija FALS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• „Precenjena“ dijagnoza ALS kod rođaka</li> <li>• Pogrešna dijagnoza ALS na umrlicama</li> </ul>

Većina opisanih FALS slučajave u literaturi zasnovana je na pojavi dva obolela člana u jednoj porodici. Na osnovu stepena procenjenog rizika oboljevanja od ALS nakon 60. te godine (verovatnoća 1:400), moguće je zaključiti da je verovatnoća da druga osoba razvije bolest u istoj porodici bude i sasvim slučajna (sporadična). Međutim, ukoliko je u jednoj porodici tri ili više obolelih sa verifikovanjem iste mutacije manje je verovatno da se radi o slučajnosti (sporadičnosti), već o pravoj genetskoj osnovi bolesti. Do sada je zabeleženo da se SOD1 mutacije javlja kod 20% obolelih FALS pacijenta, kao i od nedavno verifikovana c9orf72 mutacija kod oko 40% obolelih FALS pacijenta, mada za sada nedostaju uniformisani rezultati epidemioloških studija. Dokaz o ispoljavanju bolesti sa određenom mutacijom je osnova u dijagnostici familijarnog ispoljavanja ALS. Na osnovu poslednjih literaturnih podataka, predložena je klasifikacij FALS u tri grupe (Byrne et al 2012):

- ✓ Definitivna FALS,
- ✓ Verovatna FALS,
- ✓ Moguća FALS.

Detaljni dijagnostički kriterijumi dati su u Tabeli 5.

Tabela 5. Dijagnostički kriterijumi za FALS

<b>Definitivna FALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anamnestički:</b> ALS pacijent sa najmanje dva rođaka prvog ili drugog stepena koji boluje od ALS</li> <li>• <b>Genetski:</b> ALS pacijent sa najmanje jednim obolelim članom porodice i verifikovanom istom genetskom mutacijom</li> </ul>
<b>Verovatna FALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anamnestički:</b> ALS pacijent sa najmanje jednim rođakom obolelim od ALS prvog ili drugog stepena srodstava</li> </ul>
<b>Moguća FALS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anamnestički:</b> ALS pacijent sa pozitivnom porodičnom anamnezom, ali se bolest nije ispoljila kod rođaka prvog ili drugog stepena srodnosti</li> <li>• <b>Genetski:</b> sporadični ALS pacijent bez pozitivne porodične anamneze, i verifikovanom mutacijom</li> <li>• <b>Neurodegenerativne bolesti u porodičnoj anamnezi:</b> ALS pacijent sa pozitivnom porodičnom anamnezom i potvrđenom FTD kod rođaka prvog stepena srodnosti</li> </ul>

Prihvatanje ove klasifikacije FALS bolesti omogućila bi adekvatnu procenu učestalosti poznatih genskih mutacija prema geografskim, etničkim i/ili drugim principima i omogućavala bi tačan kvantitativni broj obolelih pacijenta sa određenim dobro poznatim genskim mutacijama. Takođe, ovakva klasifikacija bi mogla da posluži kao dobar model za davanje genetskog saveta. Ovi kriterijumi klasifikacije FALS trebalo bi da budu uvršteni i u sledeću reviziju važećih El Escorial kriterijuma bolesti.

### 1.7.2. ALS plus sindromi

Sa revidiranim El Escorial kriterijumima 1998.godine prvi put se u kliničkoj praksi definiše i pojam „ALS plus sindroma“. Ovi sindromi podrazumevaju razvoj kliničke slike ALS u okviru specifičnih stanja ili pak u specifičnim krajevima sveta, ili pak u sklopu bolesti koje mogu da imitiraju ALS, a da to nisu (Tabela 6).

Tabela 6. ALS plus sindromi

<p><b>ALS plus sindromi</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SALS u okviru različitih geografskih fokusa-endemske ALS varijante</li> <li>• ALS/demencija/parkinsonizam kompleks (Guam)</li> <li>• Madras varijanta (Indija)</li> <li>• Monomelička amiotrofija (Indija, Japan)</li> <li>• SALS sa demencijom i/ili parkinsonizmom</li> <li>• SALS sa cerebelarnom degeneracijom</li> <li>• SALS sa autonomnom zahvaćenošću</li> <li>• SALS sa senzitivnim sindromima</li> <li>• SALS sa supranukleranim i nukleranim okularnim poremećajima</li> </ul>
<p><b>ALS sindromi udruženi sa laboratorijskim poremećajima nejasne značajnosti</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SALS udružena sa prisustvom pozitivnog titra antitela na GM1, MAG</li> <li>• SALS sa monklonskom gamapatijom</li> <li>• SALS udružena sa limfomima</li> <li>• SALS udružena sa infektivnim oboljenjima (HIV, Neuroborelioza, Bruceloza)</li> </ul>
<p><b>Stanja slična ALS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokalna motorna neuropatija</li> <li>• Čisto motorni CIDP</li> <li>• Progresivna postmijelitisna mišićna atrofija</li> <li>• Hiperparatireoidizam, hipertireoza</li> <li>• Trovanje aluminijumom, živom, olovom</li> <li>• Paraneoplastični sindromi (sa znacima afekcija DMN u najmanje 2 regiona tela)</li> </ul>

### **1.7.3. Dijagnostički El Escorial kriterijumi (revizija iz 2015. godine)**

Na osnovu poslednje revizije El Escorial kriterijuma doneti su sledeći zaključci:

- dijagnoza ALS zahteva minimum jedan od sledećih stavova: progresija simptoma ili znakova GMN i DMN u najmanje jednom regionu tela (“moguća” ALS) ili
- postojanje lezije DMN na osnovu kliničkog pregleda u jednom regionu i/ili potvrđan elektrofiziološki nalaz u dva ispitana regiona.

Kriterijumi su usaglašeni i za pojedine podtipove ALS, tako da se PBP može dijagnostikovati kao ALS ukoliko postoje znaci GMN i DMN u bulbarnom regionu. FA i FL sindromi se mogu dijagnostikovati kao ALS ako su prisutni znaci oštećenja DMN u najmanje dva regiona tela, bez pristnih znakova GMN. PMA se može dijagnostikovati kao definitivna ALS ukoliko su prisutni simptomi i znaci oštećenja DMN u najmanje dva ispitana (susedna) regiona uz negativan nalaz genetskog testiranja koje bi isključilo genetsku i/ili familijarnu formu bolesti. PLS je bolest GMN, te se dijagnoza ALS ne može postaviti. Kada i ako se klinički ili elektrofiziološki ispolje znaci oštećenja DMN, u najmanje jednom ispitanom regionu može se postaviti dijagnoza ALS.

FALS se može definisati kao forma bolesti ukoliko je neurodegenerativna bolest (ALS i/ili FTD) prisutna kod najmanje jednog srodnika prvog ili drugog stepena. Ukoliko postoji pozitivna porodična anamneza za ALS ili FTD u okviru tri generacije, bolest se treba smatrati familijarnom. Ukoliko kod pacijenta postoji verifikovana patogena mutaciju koja je poznata kao mogući uzročnik bolesti, a bez pozitivne porodične anamneze, takva forma bolesti se može nazvati hereditarnom ili primarno genetskom ALS (ranije “moguća FALS”). Takođe, potvrđena patogena mutacija može zameniti odsustvo znakova oštećenja GMN ili DMN, tako da se dijagnoza ALS može postaviti na osnovu prisustva znakova oštećenja GMN i/ili DMN u jednom regionu uz udruženost sa patogenom verifikovanom mutacijom (“klinički definitivna laboratorijski potvrđena ALS”).

U slučaju prisutva samo kliničkih znakova oštećenja DMN, prirodni tok bolesti, neuroimidžing studije i patološki nalazi su pokazali i znake lezije GMN (iako oni klinički ne moraju da budu prisutni). Zaključeno je da ukoliko pacijent ima znake

oštećenja DMN u dva ili više regiona, bez kliničkih znakova oštećenja GMN, dijagnoza ALS može biti postavljena, ukoliko za ispoljene znake oštećenja DMN ne postoji bolje objašnjenje. Pacijenti sa ranije definisanom varijantom “moguće” ALS koji su praćeni godinama pokazuju jako nizak stepen lažno pozitivne dijagnoze kroz vreme. U proteklih deset godina dopunska ispitivanja poput MR ili pregleda likvora imala su značajno mesto u potvrdi lezije i GMN. Vremenom će se i termini “definitivna” i “verovatna” ALS biti zamenjeni, s obzirom na sada dostupnost različitih kvantitativnih tehnika dijagnostikovanja, koji bi na precizniji način izrazili stepen oštećenja posebno GMN. Prisustvo demencije ne isključuje postojanje dijagnoze ALS, te bi u novim kriterijumima trebalo uvrstiti i kognitivno oštećenje kao bitan parametar, s obzirom da čak 50% ALS pacijenata ispoljava neko kognitivno i /ili bihevioralno oštećenje. Oštećenje senzibiliteta, sfinkterijalne smetnje ili poremećaj okulogira mogu biti deo kliničke prezentacije u okviru ALS, te njihovo postojanje a priori ne isključuje dijagnozu. Awaji kriterijumi su izjednačili pojavu fascikulacija na EMNG pregledu sa postojanjem fibrilacija i/ili pozitivnih oštrih talasa, ukoliko se iste javljaju na terenu hronično neurogenog obrasca. Zbog određenih prognostički povoljnijih dešavanja, subkategorije PLS i PMA treba zadržati u kliničkom izražavanju” (Ludolph A et al.2015).

Na osnovu svega pomenutog, u zaključku možemo istaći da na ALS treba pomisliti kod pacijenata starijih od 50 godina sa asimetričnom bezbolnom slabošću ekstremiteta, bez prominentnog senzitivnog ispada i sfinkterijalnih smetnji i/ili progresivnom dizartrijom sa disfagijom U početnoj fazi bolesti najčešće dijagnostičke greške se prave u odnosu na fokalne sindrome kao što su cervikalna i lumbosakralna diskopatija sa stenozom spinalnog kanala, traumatske i kompresivne neuropatije, multifokalna motorna neuropatija sa i bez kondukcionijskih blokova, mijasteniju gravis, monomeličnu mišićnu atrofiju, sindrom benignih fascikulacija, postpolio sindrom, veoma retko stanje kao što je inclusion body miozitis. Konačna i definitivna dijagnoza kod tzv. atipičnih slučajeva zahteva češće EMNG preglede u rasponu od 3-6 meseci u periodu od najmanje tri godine. U svakodnevnom radu za postavljanje dijagnoze ALS potrebno je da budu ispunjena tri od navedenih kliničkih znakova: asimetrična slabost i hipotrofija mišića ekstremiteta i/ili bulbarna slabost sa dizartrijom, hiperefleksija sa

patološkim refleksima, povišen tonus po spastičnom tipu, prisutne fascikualcije i slabost respiratorne muskulature.

### 1.8. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA ALS („ALS MIMIC“)

Tokom 2012. godine objavljen je prvi EFNS vodič (Andersen et al, 2012) za dijagnozu bolesti motornog neurona u kom se navodi i lista diferencijalnih dijagnoza. Klasifikacija svih laboratorijskih analiza i dodatnih kliničkih ispitivanja izvršena je prema stepenu značajnosti na osnovu rezultata svih dotadašnjih kontrolisanih kliničkih studija (nivo preporuke A, B, C ili preporuka dobre kliničke prakse).

Brojna su stanja koje treba razmotriti u diferencijalnoj dijagnozi ALS. Na osnovu El Escorijal kriterijuma (1998) navedena je tabelarno lista bolesti, u odnosu na anatomsku lokalizaciju mogućeg patološkog procesa, koje treba razmotriti u diferencijalnoj dijagnozi ALS (Tabela 7).

Tabela 7. Bolesti koje imitiraju ALS („ALS mimic syndromes“)

Centralni nervni sistem (mozak)	Polyglucosan body disease
Moždano stablo i kičmena moždina	Cervikalna mijelopatija i stenoza spinalnog kanala Funikularna mijeloza Primarno progresivna MS Lezije na nivou foramen magnuma (infarkt, MS; tumor) Siringomijelija Adrenomijeloleukodistrofija, Algroov Sindrom Hereditarna spastična parapareza, SCA 3
Prednji rogovi kičmene moždine	Kenedijeva bolest (bulbospinalna mišićna atrofija) Siringomijelija, siringobulbija Deficit Hexosaminidaze A, Tay-Sachs bolest Benigna momelična amiotrofija Limfom, Waldenstrom makroglobulinemia, Multipli mijelom Paraneoplastični encefalomijelitis Postiradijaciona mijelopatija Postpoliomijelitis sindrom Spinalna mišićna atrofija
Periferni nervi	Multifokalna motorna neuropatija, Čisto motorni CIDP Neuralgična amiotrofija Pleksopatije



Neuromišićna sinapsa	Myasthenia gravis - bulbarni početak bolesti
Mišić	Okulofaringealna mišićna distrofija Izolovana miopatija ekstenzora vrata, Inclusion body miozitis Neuromiotonija
Sistemske bolesti	Hipertireoza, Hipoparatiroidizam HIV infekcija Neuroborelioza, Neuroleues, Bruceloza HTLV-1 Sindrom benignih fascikulacija Intoksikacije metalima Sarkoidoza i druge imunski posredovane bolesti

Diferencijalna dijagnoza je važna i sa stanovišta lekara i pacijenta, s obzirom na to da je ALS progresivna i neizlečiva bolest. Svaki atipični znak, makar i najmanja sumnja, da postoji mogućnost drugog oboljenja, treba otkloniti usmerenim kliničkim ispitivanjima diferencijalne dijagnoze.

## 1.9. ULOGA MAGNETNE REZONANCE U DIJAGNOSTICI ALS

Korišćenje konvencionalnih tehnika magnetne rezonance (MR) mozga i kičmene moždine kod pacijenata sa sumnjom na ALS je u najvećem broju slučajeva dijagnostička procedura koja služi u cilju isključivanja drugih patoloških stanja koja mogu imitirati kliničku sliku ALS. Verifikovanje hiperintenziteta kortikospinalnog trakta na konvencionalnoj MR može biti indirektna podrška kliničkom nalazu kod sumnje na ALS. Međutim, MR do danas nije svrstana u obavezne i sigurne dijagnostičke procedure na osnovu koje se može postaviti dijagnoza BMN, tj. najdirektnije potvrditi zahvaćenost GMN u okviru bolesti (Forester et al 2013).

U proteklih deset godina postoji ekspanzija razvoja novih neurovizualizacionih tehnika koje se koriste u izučavanju /dijagnostici ALS (Menke et al 2017). Na osnovu dosadašnjih saznanja, novi revidirani kriterijumi trebalo bi da sadrže i MR karakteristike. Naime, primenom MR endokranijuma i *diffusion tensor imaging* (DTI) MR tehnike registrovana je značajna kortikalna redukcija precentralnog girusa, oštećenje na nivou kortikospinalnog puta i korpusa kalozuma što može biti od značajne

pomoći u postavljanju definitivne dijagnoze bolesti (Foerster et al 2013). Izmenjen nivo N-acetilaspargata na MR spektroskopiji u primarnom motornom korteksu i duž kortikospinalnog puta predstavlja konzistentnu pojavu kod pacijenta sa ALS („podržavajući kriterijumi“) (Pioro 2000). Prethodno navedeni nalazi bi trebalo da omoguće potvrdu lezije GMN i pre početka kliničkih ispoljavanja znakova oštećenja GMN u sklopu progresivne neurodegenerativne bolesti.

Pretpostavlja se da DTI kvantitativno ispitivanje (traktografija) i ispitivanje debljine korteksa može imati prediktivnu ulogu u prirodnom toku bolesti, kao i mogućnost da se na osnovu uočenog oštećenja mozga identifikuje podgrupa pacijenata podložnih razvoju demencije ili pak razvoju rapidno progresivne forme osnovne bolesti. Uočene su i bitne promene na traktografiji kortikobulbarnog puta kod pacijenata sa bulbarnim u odnosu na pacijente sa spinalnim početkom bolesti (Bede&Hardiman, 2014). Verifikovana oštećenja u korpusu kalozumu (redukovan denzitet i volumen vlakana) su u pozitivnoj korelaciji sa stepenom klinički ispoljene zahvaćenosti GMN i stepenom funkcionalnog oštećenja pacijenata. Precentralni girus pokazuje značajniju kortikalnu redukciju kod pacijenata sa predominantno ispoljenim znacima DMN, umerenu kortikalnu redukciju kod pacijenta sa predominantnom afekcijom GMN, i najmanju kortikalnu izmenjenost kod klasične forme bolesti gde postoji podjednaka zahvaćenost i DMN i GMN (Roccatagliata et al., 2009). Progresija hiperintenziteta signala kortikospinalnog puta ne uočava se tokom trajanja bolesti, dok se lezije okcipitotemporalnog trakta (povezuje vizuelni i entorinalni, parahipokampalni korteks) uočena na DTI sekvenci, menjaju tokom razvoja bolesti. Ovakvi nalazi mogu sugerisati hipotezu da se i prekliničke morfološke promene mogu uočiti u motornom delu korteksa pomoću MR, dok se ekstrapotorna propagacija dešava u sklopu dalje progresije bolesti (Ignjatovic et al.2013).

Kao i konvencionalna MR mozga, tako se i konvencionalni MR pregled bilo kog dela kičmene moždine standardno koristi u cilju isključivanja i/ili potvrde drugih stanja koja mogu dati kliničku sliku BMN. U poslednjih nekoliko godina započeto je i istraživanje novih tehnika na polju neurovizualizacije kičmene moždine (Bede et al 2012). Nekonvencionalnim MR tehnikama pokušano je da se verifikuju znaci oštećenja kortikospinalnog puta, kao i promene na nivou sive mase kičmene moždine. Ograničavajući i otežavajući faktor u analizi MR promena kičmene moždine su: mala

dimenzija kičmene moždine, anatomska lokalizacija (blizina koštanih struktura), nehomogena magnetna polja duž same kičme moždine koja *a priori* ne moraju da ukazuju na patološki nalaz, te tehničke promene na samim snimcima usled pokreta tokom respiracija i otkucaja srca (Cohen-Adad et al 2012). Nastavak primene nekonvencionalnih tehnika MR kičmene moždine zahteva postojanje i specifičnih tehničkih mogućnosti za njeno izvođenje. Studije poprečnog preseka kičmene moždine mogu predstavljati marker lezije DMN (oštećenja sive mase kičmene moždine). DTI promene na MRI kičmene moždine mogu sugerisati „dying back“ hipotezu u patogenezi bolesti, dok spektroskopske promene se nalaze kod SALS, ali i kod presimptomatskih FALS pacijenata u ranoj fazi bolesti.

Dosadašnjim istraživanjem uočena je tzv. atrofija kičmene moždine cervikalnog segmenta kod pacijenata sa ALS merenjem poprečnog preseka same kičmene moždine na poprečnim i sagitalnim presecima MR snimka. Posebno je izučavana atrofija u nivou cervikalnih segmenata kičmene moždine i ispitivana je korelacija sa stepenom slabosti zahvaćenih mišića na rukama. Dobijeni rezultati su ukazali na postojanje statistički značajne pozitivne korelacije, te je postavljeno pitanje da li segmentna atrofija cervikalnog dela kičmene moždine može da predstavlja novi biomarker u ALS posebno kao marker oštećenja DMN. Između stepena atrofije kičmene moždine i ALSFRS skora u navedim istraživanjima nije uočena značajna statistička korelacija. Mikrostrukturna oštećenja kičmene moždine koja se verifikuju kroz meru funkcionalne anizotropije ukazuje na moguću pozitivnu korelaciju sa ALSFRS skorom kao kvantitativnom merom stepena progresije funkcionalne onesposobljenosti (Branco et al 2014).

Tehnike koje se primenjuju u izučavanju promena kičmene moždine su i DTI i magnetni transfer (MTR). Segmentnom analizom kod ALS pacijenata uočena su posebna mikrostrukturna oštećenja na nivou lateralnog kortikospinalnog trakta. Metabolička alteracija aktivnosti različitih biomarkera je još jedna metoda koja ima mogućnost evidentiranja određenih spektroskopskih promena kod pacijenata sa ALS. Tako je u jednoj studiji uočen snižen indeks N-acetilaspata i kreatina, kao i indeks N acetilaspata i mioinozitola kod oko 40% SALS i kod oko 20% asimptomatskih nosioca SOD1 mutacija, iz FALS porodica. Takođe kod 10% asimptomatskih nosioca SOD1 FALS pacijenata uočan je snižen spektroskopski indeks mioinozitola i kreatina, a kod oko 25% SALS pacijenata je zapažen snižen indeks N-acetilaspata i holina (El

Mendili et al.2014). Longitudinalnom studijom kod ALS pacijenata uočena je pozitivna statistički značajna razlika između merenja poprečnog preseka i funkcionalne anizotropije (značajno smanjenje vrednosti) na osnovu čega je sugerisano da se može smatrati biomarkerom progresije bolesti. Takođe je registrovan i povećan indeks srednje difuznosti, što sugeriše da primena specifičnih MR tehnike pregleda cervikalnog dela kičmene moždine nezavisno od isto tako specifičnih metoda MR pregleda endokranijuma, mogu biti imidžing markeri progresije bolesti motornog neurona.

#### **1.10. NEUROPSIHOLOŠKA PROCENA PACIJENATA SA AMIOTROFIČNOM LATERALNOM SKLEROZOM**

Kognitivne ili bihejvioralne promene su prisutne kod 30-50% ALS pacijenata i pripadaju spektru frontotemporalnih disfunkcija (Beeldman et al 2016). Opisani poremećaji ne zadovoljavaju kriterijume za fronto temporalnu demencije (FTD) koja se registruje kod oko 5-15% pacijenta sa ALS. Najčešće opisivani kognitivni poremećaj kod pacijenata sa ALS je poremećaj egzekutivne funkcije. Narušena verbalna fluentnost je determinisana kao rani znak kognitivnog oštećenja kod ovih pacijenata. Pored navedenih (frontalnih) kognitivnih, kod ALS se opisuju i promene u sferi poremećaja pamćenja, vizuo-perceptivni poremećaji, narušena socijalna kognicija i narušeno emocionalno razumevanje. Takođe, registrovane su i brojne bihejvioralne promene kao što su impulsivnost, nedostatak empatije, dezinhibicija, poremećaj kontrole impulsa i drugo. Bihejvioralne promene su posebno naglašene kod genetski determinisane forme bolesti sa ekspanzijom u genu c9orf72 (Patel & Sampson 2015). Smatra se da prisustvo egzekutivne disfunkcije predstavlja klinički prognostički faktor kraćeg preživljavanja pacijenata sa sporadičnom formom bolesti.

Na osnovu neuropsihološkog nalaza ALS pacijenti se mogu klasifikovati u tri grupe: 1. pacijente koji nemaju kognitivni deficit, 2. pacijente sa blagim i 3. pacijente sa teškim kognitivnim deficitom. Potvrđeno je da ALS pacijenti, koji imaju kognitivno oštećenje svakako pokazuju progresiju u kognitivnom oštećenju, ali je to nekada teško

dokazati (pacijenti sa napredovanjem fizičke onesposobljenosti postaju netestabilni standardnim testovima primenejnim kao baterija indikovano u ovoj grupi obolelih). Može se reći da je kognitivni status povezan sa stepenom motoronog pogoršanja i stepenom i obrascem progresije na polju kognicije. Takođe je zapažen i princip da kognitivno očuvani pacijenti imaju tendenciju da ostanu kognitivno „zdravi“ (Elamin et al 2013). U nekim istraživanjima kognitivni status se pokazao kao mogući prediktor i marker u cilju razlikovanja određenih kliničkih i još preciznije genetskih podtipova bolesti. Može se reći da se postojanje kognitivnog oštećenja kod ALS može očekivati s obzirom na verifikovano patohistološko preklapanje ALS posebno sa FTD, te je i disfunkcija frontalnog režnja i najčešće opisivani poremećaj kod ALS pacijenata. Patohistološka potvrda povezanosti dva stanja, ALS i demencije, je pokazana i prisustvom nalaza pozitivnih ubikvitinskih inkluzija, TDP 43, kao i genetskom potvrdom istih mutacija kod dva stanja (npr. FUS i c9orf72) što ALS-FTD čini mogućim kontinuumom u ispoljavanju različitih fenotipova.

### **1.11. LEČENJE PACIJENATA SA ALS**

Iako je ALS neizlečiva bolest, neophodno je postaviti efikasan terapijski plan u cilju maksimalizovanja kvaliteta života, što obuhvata uključivanje multidisciplinarnog tima, pored neurologa fizijatra, logopeda, psihoterapeuta, pulmologa, gastroenterologa i nutricionista. Primena lekova u ranoj fazi bolesti je efikasnija u odnosu na primenu iste u kasnoj fazi bolesti (Brooks, 1999). Neuroprotektivna terapija ima za cilj pokušaj zaštite neoštećenih motornih neurona radi usporenja progresije bolesti. Prema navedenim hipotezama, oksidativno oštećenje doprinosi degeneraciji motornog neurona u ALS. Inhibicija ili supresija oksidativnih mehanizama, može usporiti bolest što odlaže početak, ali ne utiče na trajanje bolesti. Inhibicija glutamatnih ili apoptotičnih mehanizama nema efekta na početak bolesti, ali produžava preživljavanje, povećavajući trajanje simptomatske faze bolesti (Gurney et al., 1998). Tako, neuroprotektivna terapija različito utiču na procese inicijacije i progresije bolesti.

Praktični koncept lečenja ovih pacijenata podrazumeva inicijalni korak upoznavanja ALS pacijenta i članove porodice o prirodi bolesti i kakva je prognoza. Drugi korak je informisanje pacijenta i porodice o postojećoj terapiji. Treći korak

podrazumeva uključivanje tima koji čine medicinske sestre, psihologe, socijalne radnike, fizioterapeuta, logopeda sa osnovnim ciljevima prihvatanje bolesti i poboljšanje kvaliteta života ALS pacijenata. Četvrti korak je terapija kojoj se pribegava u toku progresije bolesti u okviru koje su sve vreme uključeni lekari i medicinske sestre uz članove porodice pacijenata, posebno gastroenterolozi kod implantiranje perkutane gastreostome (PEG) u momentu potpune kompromitacije gutanja, i pulmolozi kod primene neinvazivne ventilacije (NIV) kod respiratorne insuficijencije.

Riluzol (Rilutek) je jedini lek koji je prihvaćen od strane FDA 1996. godine u terapiji ALS. Originalno je opisan 1985. godine, kao antiepileptik iz grupe benzotiazola. Riluzol selektivno inhibira endogeno oslobađanje glutaminske kiseline, vrši inaktivaciju jonskih kanala za natrijum, moduliše intracelularne procese koji imaju ulogu u aktivaciji glutamatnih receptora. Lek se brzo resorbuje posle peroralnog davanja i metaboliše se direktnom glukuronizacijom ili oksidacijom pod dejstvom enzima citohrom P450 1A, CYP1A2. Posle multiplih doza, stabilna koncentracija riluzola u plazmi postiže se nakon 5 dana. Lek se ne sme davati pacijentima sa neutropenijom, u periodu trudnoće i laktacije, kao i osobama sa znacima hepatične insuficijencije. Potencijalni inhibitori citohrom P450 1A, CYP1A2, kao što su kafein, teofilin, kinoloni i fenacetin, mogu smanjiti brzinu eliminacije riluzola. Sa druge strane, pušenje, uzimanje lekova kao što su barbiturati i rifampicin, mogu ubrzati eliminaciju riluzola. Bitno je znati sa svojim dejstvom kod nekih pacijenata može usporiti progresiju bolesti, i da je za njegovu primenu i očekivanu delotvornost očekivano prisutvo očuvane disajne funkcije sa forsiranim vitalnim kapacitetom (FVC) iznad 60%. U urađenim studijama pokazan je pozitivan efekat riluzola na odlaganje primena mehaničke invazivne i/ili neinvazivne ventilacije za 2-3 meseca (Gordon 2011). Pored jedinog kauzalnog vida lečenja, za sada dostupnog, kod ALS se primenjuje brojna simptomatska terapija (bronhodilatatori, spazmolitici, anksiolitici, antidepresivi, terapija bola itd). Klinički znaci koji upućuju na neophodnost aplikacije nazogastrične sonde (aplikaciju PEG-a) su gubitak telesne težine veći od 10% od premorbidne TT, BMI ispod 18.5% i FVC > 50% od predviđenog. Kriterijumi za primenu NIV kod ALS pacijenata sa respiratornom insuficijencijom su FVC < 50%, PaCO<sub>2</sub> jutarnji > 6.5 kPa, noćna SaO<sub>2</sub> < 88% za > 5 min i MIP < 60 cm H<sub>2</sub>O stuba (Miller et al 2009). Predulsovi za adekvatno prihvatanje NIV u kućnim uslovima su registrovanje inicijalnih znakova noćne hipoventilacije, primenom noćne

oksimetrije, ortopneja, mlađe životno doba, spinalni početak bolesti, bez izražene slabosti na rukama, očuvanost bulbarne funkcije i ALS pacijenti bez znakova izražene kognitivne i egzekutivne disfunkcije.

## 1.12. GENETSKA OSNOVA ALS

Nakon Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, ALS je treća po učestalosti neurodegenerativna bolest. ALS predstavlja veoma heterogeni klinički, ali i patofiziološki entitet. Generalno gledano 90% ALS pacijenata pripada tzv. sporadičnoj ALS (SALS), dok 5-10% pacijenta ima genetsku ili familijarnu osnovu bolesti (FALS). Do sada je opisano više od 20 definisanih gena i pripadajućih fenotipova genetski determinisane ALS, kao i više od 30 potencijalno mogućih ili modifikujućih gena koji se povezuju sa ALS, što sugerise da se radi i o veoma heterogenom genetskom entitetu. Nažalost, i pored otkrića genskih mutacija, još uvek je odgovor o definitivnoj etiopatogenezi bolesti nepoznat. Prvi precizniji podaci o familijarnosti ispoljavanja ALS datiraju još iz 1955. godine kada su Kurland i Mulder uočili porodičnu pojavu bolesti kod 10% obolelih ALS pacijenata, a prva otkrića promena u genu za Cu/Zn superoksidismutazu 1 (SOD1) 1993. godine (Rosen et al, 1993) to su i potvrdila. U poslednjih dvadesetak godina svedoci smo pojave čitave palete gena koji se mogu naći u osnovi bolesti, iako se sa pojavom mutacije i neispoljenim fenotipom (tzv. zdravi nosioci) bolesti i dalje stavlja znak pitanja na penetrantnost proteinskih promena kod pojedinaca. Tako je kod 20% FALS pacijenta opisana mutacija u SOD1 genu, ali se vremenom otkrila i pojava mutacija u ovom genu kod SALS ili naizlgled sporadičnih formi bolesti (kod 2-7% obolelih) (Vajda et al.2017). Situacija se dodatno usložnjava i činjenicom da određene mutacije mogu pokazati tzv.nepotpunu penetrantnost ili pak pokazivati značajnu intrafamilijarnu varijabilnost u fenotipskoj ekspresiji (godine početka bolesti, stepen i brzina progresije, itd.). U prilog nepotpune penetrantnosti govore i radovi Felbecker i saradnika (2010), koji su pokazali da samo prisustvo mutacije ne mora da uslovi i kliničko ispoljavanje bolesti. Oni su kod nekoliko članova ALS porodica registrovali mutacije E100K i D90A u SOD1 genu koje nisu bile klinički manifestne (asimptomaski nosici mutacije). Ovo je dobar primer koji govori u prilog značajnog udela i sredinskih faktora u patogenezi bolesti i kod za sada

nepoznatog procenta pacijenata uslovoljava dihotomiju na sporadičnu i familijarnu ALS. Falconer je 1965. godine pokušao da objasni ispoljavanje kompleksnih kliničkih sindroma, gde zasigurno spada i ALS, postojanjem kontinuuma osobina pojedinca da eksprimira bolest prelaskom određene granice, zahvaljujući udruženom dejstvu /interakciji genetskih i sredinskih faktora.

ALS posredovana genskim promena može se nasleđivati autozomno-dominantno (AD), autozomno recesivno (AR) ili X vezano. Najčešće je u literaturi opisivano nasleđivanje bolesti po AD tipu. Pored do danas opisanih 24 formi genetski definisane bolesti (sa verifikovanih 19 patoloških genskih lokusa), postoji i veći broj gena opisanih kod pojedinačnih pacijenata koji za sada predstavljaju više mogućnost predispozicije, nego realnog uzroka nastanka bolesti (Tabela 8).

### **1.12.1. ALS1 (mutacija u genu za Cu/Zn superoksid dismutazu – SOD1)**

Još 1991. Saddique i saradnici su mapirali gen na 21. hromozomu u regionu q22.1-22.2 koji je povezan sa pojavom ALS, što predstavlja prvo genetsko otkriće na polju ove bolesti. Dve godine kasnije Rosen i saradnici (1993) u ovom lokusu opisuju mutacije u genu za SOD1. Cu/Zn superoksid dismutaza (SOD1) je enzim koji ima sledeće karakteristike: odgovoran je za prevođenje superoksidnih radikala u vodonik peroksid i najznačajniji je enzim u odbrani ćelija od oksidativnog stresa; SOD1 učestvuje u procesu peroksidacije vodonik peroksida do hidroksi radikala koji se lako eliminišu iz organizma; i na kraju katalizuje hemijsku reakciju prevođenja peroksinitrita u reaktivne nitrirajuće vrste koje se koriste za nitrovanje tirozinskih ostataka proteina. Gen za SOD1 prostire se na 11 kilobaza (kb) dugoj sekvenci genoma i sastoji se iz 5 egzona koji kodiraju polipeptid dužine 153 aminokiseline i težine 16 kilodaltona (kDa). Ovaj protein organizovan je po principu homodimernog metaloenzima, gde se svaka monomerna jedinica sastoji od osam beta nabranih ploča povezanih petljama. Do danas je u okviru SOD1 gena opisano oko 185 mutacija po svim egzonima, pri čemu se najčešće opisuje tzv. nesinonimne mutacije. Najčešće registrovane mutacije su u egzonima 4 i 5, dok su delecije i insercija gena prisutne značajno ređe. Mutacije u SOD1 genu uočene su kod oko 20% FALS pacijenata i kod oko 3% SALS pacijenata (0-11,3%). U do sada opisanim rezultatima najveća incidencija SOD1 mutacija kod



FALS pacijenta registrovana je u zemljama severne Evrope (Danska, Švedska, Finska, Škotska) kao i u Japanu i Koreji (Andersen 2006). Najčešća mutacija u SOD1 genu širom sveta je D90A, kod koje je jedino i opisan autozomno-recesivan tip nasleđivanja (u zemljama Skandinavije, Rusije) (Andersen et al 1996), dok je za sve ostale SOD1 mutacije primarni tip nasleđivanja AD. Mutacije u SOD1 genu se karakterišu kako velikom intra tako i interamilijarnom fenotipskom varijabilnošću. Izuzetak je najčešći tip mutacije u SAD, A4V (egzon 1), sa penetrabilnošću od skoro 100%, koja se uniformno klinički karakteriše ranim početkom bolesti, predominantno prisutnim znacima oštećenja DMN i veoma brzim i progresivnim tokom bolesti (Saeed et al , 2009). I druge manje česte mutacije u ovom egzonu asocirane su sa agresivnijim tokom bolesti. U Velikoj Britaniji i Japanu najčešće opisivana mutacije SOD1 gena su I113T i H46R, koje se karakterišu blažim kliničkim znacima ALS i preživljavanjem od preko 20 godina od početka bolesti. Nasuprot ovim zemljama, u Irskoj uopšte nisu registrovani pacijenti sa SOD1 mutacijama, ili nisu opisani u literaturi. D90A-homozigotna mutacija je povezana sa sporo progresivnom slabošću, početkom bolesti na donjim ekstremitetima, predominantno znacima afekcije GMN i uz atipične ne-motorne znake bolesti kao što su ataksija, neuralgični bol, senzitivne i sfinkterijalne smetnje (Conforti et al, 2009). Za razliku od homozigotne D90A mutacije, pacijenti sa heterozigotnom D90A ispoljavaju tipičnu kliničku sliku ALS (Jonsson et al, 2002). Neke SOD1 mutacije (D90A-homozigot, E100K, E100G, A89V, L84F, L84V, D76V, H46R, G37R i G10V) imaju tendenciju uniformnog fenotipskog prikazivanja, dok su ostale opisane mutacije u literaturi (A4V, C6G, G41S, N86S, D90A-heterozigot, I112M, I113T, L144F i V148I) veoma različitog opisanog fenotipa. A4V, H43R, L84V, G85R, N86S ,G93A i R115C mutacije su povezane sa brzim napredovanjem bolesti i preživljavanjem koje kod najvećeg broja obolelih ne prelazi 3 godine, dok su forme bolesti s G93C, homozigotna D90A ili H46R SOD1 mutacije udružene sa dužim preživljavanjem (u nekim slučajevima i više od 10 godina nakon početka bolesti). Međutim, pored svih ispitivanja genotip-fenotip korelacije sa određenim podtipovima SOD1 mutacija, jasno objašnjenje kako mutacija u ovom proteinu utiče na nastanak bolesti ne postoji. Gubitak enzimske aktivnosti SOD1 proteina je osporen kao mehanizam etiopatogeneze u konkretnom slučaju jer je pokazano da neki mutirani proteini SOD1 zadržavaju punu aktivnost ili da i ako pacijenti sa mutacijom u SOD1 genu imaju smanjenu aktivnost

ovog proteina, ne postoji pozitivna korelacija sa kliničkom slikom bolesti. Zapaženo je da u ćelijskoj kulturi, ekspresija mutiranog SOD1 gena dovodi do apoptoze neurona, što sugeriše moguću zadobijenu toksičnu ulogu mutiranog gena. Nekoliko studija je pokazalo da mutirani SOD1 stvara nepravilne konformacije proteina i taloži se u vidu citoplazmatskih agregata koji putem poremećaja ubikvitin-proteaznog i/ili autofagnog sistema remete mitohondrijalnu funkciju kao glavnog ćelijskog oksidativnog promotora (Sangwan & Eisenberg, 2016).

### **1.12.2. ALS 2 (alsin)**

Mutacije u ALS2 genu (homozigotna mutacija u alsin genu na 2 hromozomu 2q33.1) su odgovorne za juvenilni oblik bolesti motornog neurona, kao što su infantilna ascendentna spastična parapareza (IAHSP), juvenilna primarna lateralna skleroza (PLS) ili juvenilna ALS. Nasleđvanje je po atozomno-recesivnom tipu. Do danas je opisano više od 50 pacijenata s početkom bolesti oko prve godine života. Mutacija u ALS2 genu retko se opisuje kao uzrok adultne FALS (Li & Wu, 2016)

### **1.12.3. ALS 3**

ALS 3 je vrlo retka AD forma FALS odraslog doba sa početkom na donjim ekstremitetima, povezana je sa mutacijom na hromozomu 18q21 lokusa. Ima tipičnu kliničku prezentaciju ALS sa respiratornom insuficijencijom i smrtnim ishodom maksimalno pet godina od početka bolesti.

### **1.12.4. ALS 4 (senataksin)**

Senataxin (SETX) kada je otkriven, bio je identifikovan kao gen za tešku formu juvenilne AR ataksije sa okulomotornom apraksijom (AOA2), koja je druga najčešća recesivno nasledna ataksija nakon Fridrajhove bolesti. Kasnije, heterozigotne mutacije u ovom genu (9q34.13) su pronađene kod pacijenata sa AD oblikom juvenilne ALS (početak bolesti između 6. i 12. godine života). ALS4 se karakteriše sporo progresivnim, pre svega distalnim mišićnim slabostima i atrofijom, uz prisutvo piramidnih znakova (slično kao kod distalne hereditarne motorne neuropatije sa

centralnim manifestacijama), bez znakova slabosti bulbarne i respiratorne muskulature i znakova kognitivnog oštećenja. Do sada je verifikovano i u literaturi opisano osam mutacija u genu za SETX kako kod osoba sa FALS, tako i kod sporadičnih formi bolesti. Treba imati na umu da je jedna studija pokazala da su ranije verifikovane ALS4 “missense” mutacije u osnovi bile nepatogene i predstavljale su samo genski polimorfizam, te pozitivnost u ovom genu treba shvatiti uslovno bez adekvatne kliničke podrške (Corcia et al, 2017).

#### **1.12.5. ALS 5 (spatacsin SPG11)**

Ova forma bolesti se opisuje kod pacijenta sa juvenilnim početkom ALS, između 7. i 23. godine života; nasleđuje se AR. Tok bolesti je sporo progresivan i u kliničkoj slici dominiraju znaci oštećenja GMN. Mutaciju u ovom genu opisana je kao najčešća mutacija i kod pacijenata sa HSP i “tankim” korpus kalozumom. Odsustvo promene u corpus callosumu kao i promena u beloju masi mozga i kognitivni poremećaji mogu jasno razlikovati ALS5 fenotip od fenotipa HSP koji se karakteriše ovim plus znacima.

#### **1.12.6. ALS 6 (fuzionisan u sarkomu, FUS)**

FUS gen se nalazi u 16 hromozomu, i otkriven je 2003. godine, da bi od 2009. godine bila potvrđena mutacija u ovom genu kod ALS pacijenta (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Mutacije se javlja sa frekvencijom od 3-5% kod FALS i 1% kod SALS pacijenta, što govori u prilog da se mutacije ovog gena svrstavaju u treće po učestalosti na globalnom planu kod svih ALS pacijenata. Mutacije ovog gena posebno su opisivane i evidentirane kod ALS pacijenta u azijskim zemljama. Do danas je registrovano više od 60 mutacija u ovom genu, najčešće u egzonu 15 koji kodira za C terminalni završetak proteina. Ovaj gen kodira za DNA/RNA vezujući protein, koji je lociran u jedru i učestvuje u regulisanju genomske stabilnosti i metabolizmu RNA. Kod pacijenata sa FUS mutacijama uočeni su i FUS imunoreaktivni agregati koji se nalaze u osnovi patogenetskog procesa nukleocitoplazmatske redistribucije proteina FUS i stvaranje njegovih agregata koji su povezani sa degeneracijom neurona. Takođe je

uočeno da je veći stepen nagomilavanja navedenih agregata u citoplazmi u negativnoj korelaciji sa godinama početka bolesti kod FUS pozitivnih pacijenata. Najčešće se nasleđuje AD, mada u literaturi postoje i opisi AR forme bolesti (H517Q) i nekoliko *de novo* opisanih mutacija. Fenotipovi koje se mogu sresti sa mutacijom u FUS genu podrazumevaju tipičnu ALS, juvenilnu ALS, ALS-FTD kompleks i veoma retko izolovanu FTD. Iako većina pacijenata sa ovom mutacijom ispoljava klasičan ALS fenotip bez kognitivnih ispada, klinička slika može biti varijabilna, čak i među nosiocima iste mutacije. U poređenju sa SOD1 pozitivnim ALS pacijentima, kod FUS pozitivnih pacijenata bolest može početi nešto ranije, češće imaju znake oštećenja bulbarne muskulature i bržu progresiju bolesti. Atipične prezentacije u okviru ALS kao što su pojava parkinsonizma, demencije ili pak esencijalnog tremora mogu se videti kod nekih FUS pozitivnih pacijenata, dok je jedna FUS mutacija (R521C) opisana sa kliničkom prezentacijom „dropped head“ sindroma i proksimalnim slabostima na rukama što može da predstavlja kliničko obeležje mutacije.

#### **1.12.7. ALS 7**

ALS 7 predstavlja redak AD familijarni oblik bolesti. Ova mutacija je opisana u SAD i uočena je povezanost s ALS7 lokusom (20p13). U kliničkoj slici nije registrovana nijedna specifičnost, niti su evidentirani kognitivni ili drugi ekstramotorni poremećaji .

#### **1.12.8. ALS 8 (vesicle-associated membrane protein-associated, synaptobrevin-associated membrane protein B - VAPB)**

Ova mutacija je inicijalno bila opisana u nekoliko brazilskih porodica. Gen je lociran na 20q13.32, i može se eksprimirati kao spinalna mišićna atrofija (SMA) kasnog početka, atipični ALS ili tipični ALS fenotip. Nekoliko pacijenta sa ovom mutacijom ispoljilo je i znake autonomne abnormalnosti uključujući opstipaciju i seksualnu disfunkciju. Pored Brazila, mutacije u ovom genu opisane su i kod nekih FALS pacijenata u Japanu, Velikoj Britaniji i Holandiji.

### **1.12. 9. ALS 9 (angiogenin - ANG)**

Do sada je opisano oko 30 mutacija u ovom genu (14q 11.2), ali samo jedna (K171I) je pokazala udruženost sa pojavom kliničke ALS. Angiogenin se kao pankreasna ribonukelaza A, eksprimira većinom u hepatocitima, ali i u endotelijalnim ćelijama, gliji i motornim neuronima. Ekspresija angiogenina indukovana je hipoksijom i pokazano je da protein učestvuje u neovaskularizaciji, prorastanju i izduživanju neurona, te je njegova funkcionalnost bitna za preživljavanje motornih neurona. Mutacije u ovom genu opisane su i kod FALS i kod SALS pacijenata (posebno kod pacijenata irskog ili škotskog porekla, mada su mutacije u ANG genu opisane i u Brazilu, Kini, Francuskoj, Nemačkoj, Italiji, Holandiji, Švedskoj i SAD). U nekoliko FALS slučajeva identifikovana je udruženost ANG mutacije sa izmenjenim FUS ili SOD1 genom. Međutim, mutacija gena za ANG uočena je i kod zdravih pojedinaca kao i kod pacijenata sa izolovanom FTD ili Parkinsnovom bolešću (Pan et al, 2016).

### **1.12.10. ALS 10 (transaktivni DNK, RNK-vezujući protein - TDP-43)**

Prva mutacija u ovom genu opisana je 2008. godine (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008) i verifikovana je kod oko 4% FALS i oko 1% SALS pacijenata (slično kao i mutacija u FUS genu). Do danas je opisano više od 50 mutacija u ovom genu (1 p36), najvećim delom su locirane u C-terminalnom delu koji je kodiran egzonom 6 TDP-43 proteina. Ovaj protein je opisan kao glavna komponenta ubikvitarnih citoplazmatskih inkluzija koje su prisutne u degenerativno izmenjenom motornom neuronu kod ALS pacijenata. Vezivanje ovog proteina u agregate moglo bi da ima negativnu ulogu u njegovoj funkcionalnosti, samim tim da dovede i do neurotokičnosti preko mehanizma izmenjenog funkcionisanja ubikvitin-proteaznog i autofagnog-lizozomskog sistema. Pored nagomilavanja u ćelijama motornih neurona, TDP-43 se nagomilava u svom izmenjenom hiperfosforilisanom obliku i u ćelijama mikroglije, koje imaju svoju ulogu pre svega u imunopatogenezi ALS. TDP-43 inkluzije ispoljavaju patogenost bez obzira na osnovnu funkciju samog proteina, te se TDP-43 smatra mogućim principanim kandidat genom za ALS. Najveći

broj opisanih mutacija u ovom genu su „missense“ mutacije koje se nasleđuju AD. Pacijenti sa ovim mutacijama u najvećem broju slučajeva mogu imati raniji početak bolesti, sa prvim simptomima predominantno na gornjim ekstremitetima i duže trajanje bolesti u poređenju sa SALS pacijentima. Međutim, opisana je i rasna razlika ispoljavanja mutacije u TDP-43 genu, tako da je kod više od 50% pozitivnih TDP43 pacijenata sa ALS bele rase početak bolesti bio na gornjim ekstremitetima, dok je kod skoro 60% TDP-43 pozitivnih pacijenta u Aziji imalo bulbarni početak. Takođe, sa mutacijama u TDP 43 genu u literaturi su opisivani i pacijenti sa izolovanom FTD, ALS-FTD kompleksom kao i ALS sa parkinsonizmom i FTD sa parkinsonizmom.

#### **1.12.11. ALS 11 (indukovan faktor 4 - FIG4)**

Mutacija u FIG 4 genu odgovaran je za AR formu Charcot-Marie-Tooth (CMT) bolesti koja se karakteriše ranim početkom i zahvaćenošću i senzitivnih i motornih nerava (Tazir et al, 2013). Kasnije, ova ista mutacija opisana je i kod nekoliko SALS i FALS pacijenta kod kojih je uočen AD princip nasleđivanja. Fenotip je i dalje kontroverzan s obzirom da se radi o pojedinačnim „privatnim“ mutacijama na osnovu kojih se ne može dati sigurna opservacija na polju genotip-fenotip korelacije. Takođe, ova mutacija je opisana i kod nekih pacijenta sa PLS, Yunis-Varon sindromom (kleidokranijalna displazija, odsustvo palca na šakama i distalna afalangija), kao i kod familijarne epilepsije sa polimikrogirijom.

#### **1.12.12. ALS 12 (optineurin - OPTN)**

Mutacija u ovom genu lociranom na 10p 15-14 inicijlano je opisana kod pacijenata sa glaukomom otvorenog ugla, a od 2010. je uočena pozitivnost kod pre svega japanskih pacijenata sa SALS (kod 4%) i FALS formom bolesti (kod 0.5%). Opisani su i AD i AR načini nasleđivanja, a bolest obično ima sporo progresivni tok i raniji početak simptoma bolesti. Neki pacijenti sa mutacijom u ovom genu mogu imati i ekstrapiramidne znake, afaziju ili FTD kao deo atipične kliničke prezentacije (Li & Wu, 2016).

#### **1.12.13. ALS 13 (ataksin-2 - ATXN2)**

Mutacija u ovom genu opisana je kod pacijenata sa spinocerebelarnom ataksijom tip 2 (SCA2). SCA 2 kao bolest trinukleotidnih ponovaka determinisana je prisustvom više od 33 CAG ponovaka, dok se kod ALS pacijenata sa ovom mutacijom opisuje broj ponovaka u intremedijarnoj zoni od 27-33 i još uvek nedovoljno jasnom genotip-fenotip korelacijom jer nije uočena pravilnost prisutnog broja ponovaka sa vremenom početka i dužinom trajanja ALS kod ovih pacijenata. Uticaj ATX2 mutiranog gena opisana je i u patogenezi TDP-43 izmenjenog proteinskog sklopa u okviru bolesti motornog neurona (Li et al, 2016).

#### **1.12.14. ALS 14 (protein koji zadrži valozin - VCP)**

Inicijalno mutacija u ovom genu opisana je kod pacijenata sa inclusion body miozitisom (IBM), Padžetovom bolešću i FTD (IBMPFD) (Kazamel et al, 2016). Nedavno je mutacija ovog gena identifikovana u italijanskoj porodici sa AD familijarnim ispoljavanjem ALS-a (Tiloca et al ,2012). Velika intrafamilijarna fenotipska heterogenost je karakteristika mutacije u ovom genu, s obzirom da klinička slika varira od IBMPFD preko FALS, SALS i SALS-FTD. Ovakvo otkriće može da sugeriše da se bolest motornog neurona može uklopiti u fenotipsku varijabilnost u sklopu VCP multisistemske proteinopatije, nego pak izolovana bolest za sebe.

#### **1.12.15. ALS 15 (ubiquillin 2 - UBQLN2)**

Mutacija u ovom genu je opisana kod X-vezanog nasleđivanja bolesti motornog neurona. Predomominantni fenotip ispoljavanja mutacije je ALS, mada neki pacijenti mogu imati i kognitivne promene u sklopu FTD. Bolest ranije počinje kod muškaraca jer su muškarci homozigotni nosioci opisane mutacije.

#### **1.12.16. ALS 16 (sigma ne-opioidni intracelularni receptor 1 - SIGMAR 1)**

Inicijalno, ova mutacija je opisana u porodici sa AR juvenilnom formom ALS u Saudijskoj Arabiji sa konsangvinitetom u anamnezi. U nekim slučajevima opisana je pojava mutacije ovog gena i kod pacijenta sa FTD, ali su isti pacijenti imali i ekspanziju nekodirajućeg heksonukletidnog ponovka GGGGCC na hromozu 9 (c9orf72), te se sa sigurnošću ne može reći da je mutacija u SIGMAR1 genu bila u osnovi FTD.

#### **1.12.17. ALS 17 ( hromatin modifikujući protein 2B - CHMP2B)**

Ova mutacija je pre svega opisana kod pacijenata sa FTD, retko kod pacijenata sa ALS-FTD kompleksom. U kliničkoj prezentaciji ALS dominiraju znaci oštećenja DMN. Mutacija u ovom genu verifikovana je i kod pacijenta sa progresivnom mišićnom atrofijom.

#### **1.12.18. ALS 18 (profilin 1 - PFN1)**

„Misense“ mutacija u ovom genu je opisana kod 2 ALS porodice i 7 FALS pacijenata. Analizom veće kohorte pacijenta sa ALS-om i FTD iz svih delova sveta utvrđeno je da ova mutacija predstavlja izuzetno retko uzrok FALS, sa klasičnim spinalnim početkom bolesti i bez znakova kognitivnog oštećenja.

#### **1.12.19. ALS 19 (v-erb-b2 receptor tirozin kinaze 4 - ERBB4)**

Bolest je opisana kod japanske ALS porodice, sa AD tipom nasleđvanja i kasnijim početkom bolesti. Bolest je sporo progresivnog toka i bez kognitivnog oštećenja u opisanih članova.

#### **1.12.20. ALS 20 (heterogeni ribonuklearni protein A1 - hnRNPA1)**

Egzonskim sekvencioniranjem genoma verifikovana su mutacije u ovom proteinu kod pacijenta koji su imali kliničku sliku ALS i/ili multisistemsku proteinopatiju (IBMPD, valosin like mutacije). U daljim istraživanjima nije dokazano



sigurno prisustvo ove mutacije u velikoj kohorti ispitanih ALS pacijenata, kao i pacijenata sa FTD, te se smatra da je prisustvo ove mutacije još uvek kontroverza u mogućoj patogenezi nekih subformi bolesti motornog neurona.

#### **1.12.21. ALS 21 (matrin 3 - MATR3)**

Ova mutacija dokazana je kod pacijenata sa FALS kao i kod pacijenta sa FTD. Inicijalno je mutacija u ovom genu bila verifikovana kod pacijenata sa AD distalnom miopatijom i paralizom glasnih žica u velikoj multigeneracijskom porodičnom ispoljavanju (Senderek et al, 2009). Heterozigotna mutacija u MATR3 genu dokazana je kod SALS pacijenta sa bulbarnim početkom, dok je kineska grupa autora opisala pojavu mutacije kod dve sestre (AR tip nasleđivanja) koje su ispoljile kliničku sliku predominantnog oštećenja DMN (Leblond et al 2016).

#### **1.12.22. ALS-FTD1 (c9orf72 mutacija)**

Sve do 2011. godine smatralo se da su najzastupljenije mutacije kod FALS pacijenta mutacija u SOD1 genu; tada je u dve velike nezavisne studije otkriveno prisustvo velike GGGGGCC (heksanukleotidne) ponovljene ekspanzije u nekodirajućem regionu hromozama 9p.21 (c9orf72) kod pacijenata sa udruženošću ALS i FTD (DeJesus Hernandez et al.; Renton et al.2011). Po svim, do danas objavljenim radovima, ekspanzija u c9orf72 genu predstavlja najčešći uzrok FALS (23.5-40%) i porodične FTD (11.7-25%) u svetu. U porodicama sa pojavom ALS-FTD kompleksa zajedno pozitivnost raste na 50-72%. Ipak, daljim istraživanjima potvrđeno je geografsko predominantno ispoljavanje ove mutacije pre svega u zemljama Evrope i Severne Amerike, dok je učestalost u azijskim zemljama mala. Sa ekspanzijom u ovom genu, pored sada već klasičnih fenotipova SALS, FALS, ALS-FTD i FTD, opisani su i drugi neurološki fenotipovi kao što su PMA, PLS, ali je ista registrovana i kod Huntingtonove, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (Cooper-Knock et al, 2015). Kliničke karakteristike ALS pacijenata sa c9orf72 ekspanzijom heksonukleotidnih ponovaka su pre svega prisustvo bulbarne simptomatologije (koja je veoma retko ispoljena u npr.SOD1 FALS), kognitivna disfunkcija i kraće trajanje bolesti (agresivniji

tok bolesti posebno ako je ispoljeno više od 23 ponovaka) u odnosu na fenotipove TDP-43 ili većinu SOD1. Nije uočena korelacija ispoljene dužine ponovaka i fenotipa bolesti, kao ni korelacija dužine ponovaka sa ranijim početkom bolesti. Kod 7% SALS pacijenata uočena je takođe ekspanzija u genu za c9orf72. Sama uloga gena nije poznata, ali je potvrđen njen uticaj na stvaranje TDP43 pozitivnih inkluzija, kao i generalni uticaj na patološki metabolizam RNK, koji po svim najnovijim istraživanjima može predstavljati trenutno najbliže objašnjenje nastanka bolesti motornog neurona kao što je ALS, ali i tau negativnih FTD.

### 1.12.23. ALS-FTD2 (CHCHD10)

Nedavno je verifikovana mutacija u ovom genu u velikoj porodici sa ALS kasnog početka uz pojavu kliničke slike FTD, cerebelarne ataksije i miopatije u isto vreme (Bannwarth et al, 2014). Pretpostvalja se da je nestabilnost mitohondrijalne DNA u osnovi opisanih multiplih delecija kao osnova ovog genskog poremećaja.

### 1.12.24. Serin/treonin (TANK)-vezujuća kinaza 1 (TBK1)

Udruženost promene u ovom genu uočena je kod ALS pacijenata sa mutacijom u optineurinu (ALS12). Ovi pacijenti u kliničkom ispoljavanju mogu imati kognitivno oštećenje, što je i potvrđeno u nezavisnoj studiji sa FTD-TDP pacijentima kod kojih je pronađena varijanta mutacije u TBK1 genu. Ovi rezultati sugerišu ključnu ulogu OPTN/TBK1 puta u patogenezi ALS-a i FTD (Freischmidt et al, 2017).

Tabela 8. Genetske forme ALS

Genetski subtip ALS	Lokus	Gen	Protein	Početak bolesti	Nasleđivanje	Prezenta-cija	Izolelske bolesti
ALS1	21q.22.1	SOD1	Cu/Zn SOD	Adultni	AD/AR	Tipična	/
ALS2	2q33-35	Alsin	Alsin	Juvenilni	AR	Spora progresija, lezija GMN	PLS
ALS3	18q21	Nepoznat	Nepoznat	Adultni	AD	Tipična, početak na DE	/

<b>ALS4</b>	9q34	SETX	Senataksin	Juvenilni	AD	Spora progresija, dHMN sa piramidnim znacima	SCAR1 i AOA2
<b>ALS5</b>	15q15-21	SPG11	Spatacsin	Juvenilni	AR	Spora progresija	HSP
<b>ALS6</b>	16p11.2	<b>FUS</b>	Fused in sarcoma	Adultni / juvenilni	AD/AR	Tipična	/
<b>ALS7</b>	20p13	Nepoznat	Nepoznat	Adultni	AD/AR	Tipična	/
<b>ALS8</b>	20q13.3	VAPB	VAPB	Adultni	AD	Tipična i atipična	SMA
<b>ALS9</b>	14q11.2	<b>ANG</b>	Angiogenin	Adultni	AD	ALS, FTD, parkinsonizam	/
<b>ALS10</b>	1p36.2	<b>TARDBP</b>	TAR DNA vezujući protein	Adultni	AD	Tipična	/
<b>ALS11</b>	6q21	FIG4	Fosfoinoziti d-5-fosfataza	Adultni	AD	Brzo progresivni tok sa znacima GMN	CMT4J
<b>ALS12</b>	10p13	<b>OPTN</b>	Optineurin	Adultni	AD/AR	Sporo progresivni tok na GE ili DE i znacima GMN	Primarni glaukom otvoreno g ugla
<b>ALS13</b>	12q22-23	ATXN2	DAO	Adultni	AD	Tipična za ALS	/
<b>ALS14</b>	9p13.3	VCP	Valozin sadržeći protein	Adultni	AD	Sa ili bez FTD	IMB-PFTD
<b>ALS15/ALSX</b>	Xp11	UBQLN2	Ubiquilin 2	Adultni / juvenilni	XD	Znaci GMN primarno	/
<b>ALS16</b>	9p13.2-21.3	SIGMAR1	SIGMAR1	Juvenilni	AD	Tipična	FTD
<b>ALS 17</b>	3p12.1	CHMP 2B	CHMP 2B	Adultni	AD	Tipičan	PMA, PD

<b>ALS 18</b>	17p13.2	PFN1	Profilin 1	Adultni	AD	Spinalni početak	/
<b>ALS 19</b>	2q33.3	ERBB4	ERBB4	Adultni	AD	Bulbarni početak	/
<b>ALS 20</b>	12q13.1	hnRNPA1	hnRNPA1	Adultni	AD	Tipičan	MSP
<b>ALS 21</b>	5q31.1	MATR3	MATR3	Adultni	AD	Tipičan	Distalna miopatija
<b>ALS-FTD1</b>	9p21	C9orf72	C9orf72	Adultni	AD	Bulbarni početak i FTD	FTD
<b>ALS-FTD2</b>	/	CHCHD10	CHCHD10	Adultni	AD	ALS i FTD	FTD
/	2p13	DCTN1	Dinaktin	Adultni	AD	Distalna hereditarna motorna neuropatija sa paralizom glasnica	/
<b>ALS-FTD4</b>		Serin/treoni n (TANK)-vezujuća kinaza 1	TBK1	Adultni	/	ALS	FTD

### 1.13. ZNAČAJ KLINIČKO-GENETSKE ANALIZE KOD PACIJENATA SA GENETSKOM I/ILI FAMILIJARNOM ALS

Identifikovanje genetske osnove ALS je jedan od načina koji omogućava veći stepen saznanja o samom proteinu i njegovoj izmenjenoj funkciji usled opisane mutacije, samim tim o uticaju na patogenezu bolesti. Neophodno je identifikovati da li je opisana mutacija upravo ta koja dovodi do fenotipskog ispoljavanja bolesti motornog neurona ili samo genski polimorfizam koji nema direktne veze sa pojavom bolesti. Sve je bazirano na teorija da učestalost „negativnih“ osobina organizma koje bivaju eliminisane prirodnom selekcijom, iznosi manje od 1%, odnosno da je postojanje genskog polimorfizma kao promene *per se* veće od 1%. Bitno je odrediti i tačnu nukleotidnu zamenu, koja dovodi do promene u aminokiselinskom nizu proteina, tip

promene koji dovode do mutacije na nivou strukture i funkcije proteina i sve zajedno korelirati sa familijarnim ispoljavanjem bolesti, ukoliko postoje dostupni podaci. Genetska osnova je kao što smo već pomenuli prisutna kod svega 5-10% ALS pacijenata koji mogu imati atipično kliničko ispoljavanje, bržu ili sporiju progresiju bolesti, kao i specifičnost zahvatanja drugih deova centralnog i perifernog nervnog sistema. Precizno definisanje već poznatih genskih mutacija u jednoj definisanoj populaciji imalo bi ulogu u:

- Potvrđivanju kliničkog ispoljavanja genetske bolesti (u čijoj osnovi je mutirani gen) u odnosu na sporadične slučajeve;
- Preciznom karakterisanju genotip-fenotip korelacije kod mutacija gde je opisan veći broj obolelih u jednoj porodici ili regionu, i određivanju eventualnog efekta osnivača na određenom području;
- Preciznijem epidemiološkom preseku učestalosti određenih mutacija na određenom geografskom području;
- Formiranju algoritma u molekularno-genetskoj analizi ALS pacijenata kod kojih postoji sumnja da se može raditi o FALS;
- Primeni genske (antisens) terapije u lečenju precizno definisanih genetskih stanja;
- Formiranju stava o stepenu senzitivnosti i specifičnosti određenog genetskog savetovanja u prenatalnoj dijagnostici zasnovanom na penetrantnosti ispoljavanja genetske mutacije kroz jasno ispoljen klinički fenotip.

#### **1.14. GENSKA TERAPIJA ALS**

Sa verifikovanjem genetskih promena koje mogu biti u osnovi ALS, uspešno su kontruisani životinjski modeli koji bi na što približniji način imitirali pojavu bolesti slično kao kod ljudi. Do danas su uspešno kontruisani animalni modeli koji odgovaraju SOD1, TDP 43, FUS i c9orf72 tipu bolesti, te je na njihovom primeru i ispitivana mogućnost genske terapije bolesti. Sva do sada primenjivana genska terapija se može aplikovati intratekalno, intraventrikularno ili intravenski uz pomoć vektora za koje su poslužili adeno- ili lentivirusi. Sumarno gledano danas se mogućnost genske terapije u ALS svodi na nekoliko potencijalnih oblika:

a) primena oligonukleotidne »antisense« terapije koja predstavlja sintetske oligonukleotide dužine 15-25 nukleotida koji se vezuju za ciljanu mRNK; ova terapija redukuje ekspresiju patološki izmenjenog proteina na dva načina: razgradnjom pogrešno sintetisane mRNK ili blokadom translacije mRNK; ovaj vid terapije redukuje nivo patološki izmenjenih proteina kao što su TDP 43, SOD1 i FUS, ili pak blokira translaciju RNK fokusa sintetisanih u sklopu ekspanzije GGGGCC(c9orf72).

b) primena malih, dvolančanih interferirajućih RNK koje svoje dejstvo ostvaruju kroz intreferenciju u sintezi RNK; nakon odmotavanja, jedan lanac ovih RNK se vezuje za patološki izmenjenu RNK i formira tzv. nemi RNK kompleks i na taj način utiče na dalju sintezu mRNK.

c) transfer gena je još jedan od mogućih i pretpostavljenih mehanizama dejstva potencijalne i buduće genske terapije; naime, virusni vektor može zameniti određeni patološki izmenjeni genski segment koji se nalazi u osnovi bolesti; ovaj model je uspešno testiran u spinalnoj mišićnoj atrofiji sa povoljnim efektom, ali na polju ALS zahteva dalja istraživanja.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Molekularno-genetsko ispitivanje pacijenata sa FALS i SALS, uključujući sledeće gene: SOD1, C9orf72, TDP-43, ANG i FUS.
2. Određivanje tipičnih kliničkih simptoma i znakova u subpopulaciji pacijenata sa FALS u poređenju sa SALS.
3. Ispitivanje korelacija kliničkih i genetskih karakteristika.
4. Analiza preživljavanja pacijenata sa ALS.
5. Poređenje nalaza neuropsihološkog testiranja pacijenata sa genetskim ALS u poređenju sa SALS bez verifikovanih mutacija.
6. Ispitivanje morfoloških specifičnosti mozga i kičmene moždine pacijenata sa FALS pomoću savremenih metoda magnetne rezonancije.
7. Ispitivanje međusobne povezanosti rezultata genetskih, neuropsiholoških i radioloških analiza.
8. Predlog genetskog savetovanja kod pacijenata sa ALS u populaciji Srbije na osnovu dobijenih rezultata istraživanja.

### **3. MATERIJAL I METODE**

Izrada ove doktorske disertacije odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, odluka broj 29/XI-6 od 20.11.2013. godine.

#### **3.1. PACIJENTI**

U ovo ispitivanje uključen je 241 pacijent hospitalnog registra Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije koji su registrovani u kompjuterskoj bazi podataka Infomedis pod dijagnozom ALS (koji su ispunjavali El Escorial kriterijume za definitivnu ili verovatnu ALS), a koji su hospitalno i ambulantno lečeni u periodu od februara 2013. do februara 2016. godine. Kod 241 pacijenta sa ALS obavljeno je genetsko testiranje, kod 183 pacijenta testiranje je obavljeno u Genetskoj laboratoriji Klinike za neurologiju KCS, a kod ostalih 59 pacijenata je testiranje obavljeno u genetskoj laboratoriji Univerziteta u Masačusetsu, SAD u saradnji sa prof. dr John-om Landers-om. Pacijenti su testirani na sledeće mutacije: SOD1 (svih 5 egzona), TDP 43 (egzon 6), FUS (egzon 14 i 15), c9orf72 i ANG.

Svatom ispitaniku je detaljno objašnjeno u kojim ispitivanjima bi trebalo da učestvuje, kao i da bi bila neophodna hospitalizacija u stacionaru ili dnevnoj bolnici Klinike u trajanju od oko dve sedmice. Svi ispitanici kod kojih su vršene analize van regularnog dijagnostičkog protokola potpisali su dodatni informisani pristanak za učešće u studiji.

#### **3.2. MOLEKULARNO-GENETSKO ISPITIVANJE**

Kao biološki materijal korišćena je periferna krv uzorkovana od svih ispitivanih pacijenata tokom hospitalizacije na Klinici za neurologiju. Uzimano je po 5 ml krvi, a kao antikoagulans je korišćen natrijum-citrat u koncentraciji 0,38 % (w/v). Uzorci su do finalne analize čuvani na -20°C. DNK je izolovana iz krvi neposredno pred molekularno-genetsku analizu.



Za detekciju tačkastih mutacija i malih duplikacija i delecija u kodirajućim regionima gena *SOD1* i *ANG* gena, kao i odabranim regionima gena *FUS* i *TDP43* korišćena je metoda direktnog sekvenciranja. Detekcija ekspanzija heksanukleotidnih ponovaka u *c9Oorf72* genu vršeno fragmentnom analizom.

### **3.2.1. Izolovanje genomske DNK iz limfocita periferne krvi**

Genomska DNK je izolovana upotrebom *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (*Life Technologies*, SAD). Ovaj kit je namenjen za brzu izolaciju ukupne DNK iz pune krvi, plazme, seruma, taloga leukocita, kostne srži, drugih telesnih tečnosti, kultivisanih ćelija, tkiva i forenzičkih uzoraka. Prema uputstvu proizvođača, izolacija DNK obuhvata liziranje limfocita puferom za lizu u prisustvu proteinaze K, vezivanje molekula DNK za silikonsku membranu „*mini spin*“ kolonica, ispiranje DNK radi odstranjivanja proteina i inhibitora PCR reakcija i eluiranje DNK u odgovarajućem puferu ili redestilovanoj vodi. Očekivani prinos iz 200 µl pune krvi je oko 6 µg ukupne DNK.

Kvalitet i količina izolovane DNK su određivani spektrofotometrijom, koja se zasniva na merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Talasna dužina na kojoj nukleinske kiseline apsorbuju maksimum svetlosti je 260 nm, tako da količina apsorbovane svetlosti na toj talasnoj dužini odgovara koncentraciji DNK u ispitivanom uzorku. Čistoća uzorka DNK na spektrofotometru je određivana pomoću apsorbance izmerene na talasnim dužinama od 230, 280 i 340 nm. Merenja su vršena na spektrofotometru *BioPhotometer Plus* (*Eppendorf*, Nemačka) u plastičnim kivetama *Uvette* (*Eppendorf*, Nemačka).

### **3.2.2. Lančana reakcija polimerizacije**

PCR (reakcija lančane polimerizacije, eng. Polymerase Chain Reaction) (Mullis and Faloona 1987; Saiki et al. 1988) je selektivna *in vitro* amplifikacija unapred definisanog segmenta DNK molekula. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom (*Taq* polimeraza). Specifičnost PCR-a se ogleda u korišćenju prajmera, oligonukleotidnih sekvenci dužine 14-40 nukleotida, koji hibridizuju sa

komplementarnim sekvencama na DNK molekulu i na taj način ograničavaju segment DNK koji se amplifikuje. Osim DNK matrice, prajmera i polimeraze u PCR reakcionoj smeši su potrebne i sledeće komponente: nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), joni magnezijuma, pufer i aditivi. PCR se odvija u 25-40 ponovljenih ciklusa sinteze DNK molekula (termalna denaturacija, hibridizacija prajmera i ekstenzija-sinteza DNK) i na taj način se dobija  $10^6$  do  $10^9$  kopija željenog fragmenta. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se kompletirala sinteza parcijalno sintetisanih produkata. PCR reakcije su izvođene u GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 ili Veriti (*AppliedBiosystems, SAD*).

Uspešnost PCR reakcija je proveravana primenom horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu koji sadrži cijaninsku boju SYBR<sup>®</sup> Safe (*Life Technologies, SAD*). Boja interkalira u molekul DNK i ima sposobnost da pod uticajem UV svetlosti intenzivno fluorescira i omogućava uočavanje produkata PCR reakcije u obliku narandžastih traka na gelu. U polju jednosmerne struje fragmenti DNK u agaroznom gelu putuju u funkciji svoje dužine. Očekivana dužina PCR produkta se procenjuje poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina.

Amplifikovani fragmenti koji su se dalje sekvencionirali prvo se prečišćeni od ostataka neugrađenih prajmera i nukleotida, koji su mogli uticati na reakciju sekvenciranja. U ovom istraživanju je primenjivano enzimsko prečišćavanje i korišćena su dva enzima: egzonukleaza, označena kao *Exonuclease I* (*Fermentas, Nemačka*) i alkalna fosfataza, označena kao *Fast alkaline phosphatase* (*Fermentas, Nemačka*).

U slučaju određivanja broja ponovaka u *c9orf72* genu, standardnim fluorescentnim PCR i fragmentnom analizom mogu se detektovati samo neekspandovani aleli. Stoga, za svakog pacijenta kod koga se pokaže postojanje samo jednog normalnog alela, odnosno kod koga se utvrdi status homozigota za alel normalne velične, vrši se i tzv. “repeat primed PCR”. Ova metoda predstavlja modifikaciju fluorescentne PCR metode gde je jedan prajmer dizajniran tako da u sebi sadrži i sekvencu samih ponovaka. Ovakav prajmer može da hibridizuje na više uzastopnih mesta u nizu ponovaka i tako se u jednoj reakciji amplifikuje veći broj fragmenata koji se međusobno razlikuju za onoliko baznih parova kolika je dužina jednog ponovka. Razdvajanje ovih fragmenata kapilarnom elektroforezom daje karakterističan signal koji se sastoji iz niza signala opadajućeg intenziteta (eng. saw tooth pattern).

### 3.2.3. Kapilarna elektroforeza

Nakon PCR, korišćena je metoda kapilarne elektroforeze. Kapilarna elektroforeza je automatizovan proces u kome se elektroforeza vrši kroz vrlo tanke kapilare ispunjenu polimerom. Ovom metodom mogu da se razdvoje fragmenti koji se razlikuju u dužini samo za 1bp. Aparat na kome se kapilarna elektroforeza izvodi naziva se automatski DNK sekvenator. Prilikom elektroforeze kraći fragmenti putuju brže i prvi stižu do kraja kapilare gde se nalazi prozor za detekciju. Fragmenti koji se razdvajaju su obeleženi fluorescentnim bojama, pa kada stignu do prozora za detekciju, gde nailaze na laserski zrak, boja kojim je fragment obeležen se ekscituje i pri vraćanju iz ekscitovanog u nepobuđeno stanje emituje svetlost talasne dužine karakteristične baš za tu boju. Emitovana svetlost se detektuje CCD kamerom (eng. *charge-coupled device* - CCD), a redosled javljanja signala, boja od koje signal potiče i intenzitet signala se pamte u softveru za prikupljanje signala.

Kapilarna elektroforeza je našla najširu primenu u DNK sekvenciranju i fragmentnoj analizi. DNK sekvenciranjem se određuje tačan nukleotidni sastav neke sekvence, dok se u fragmentnoj analizi vrši određivanje dužine razdvajanih fragmenata njihovim poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina.

### 3.2.4. Sekvenciranje uzoraka

Metod direktnog sekvenciranja koji je primenjen u ovom istraživanju se naziva *Dye-terminator* sekvenciranje i u reakciji se koriste dideoksiribonukleozid trifosfati obeleženi različitim fluorescentnim bojama. Kao i kod klasičnog Sangerovog sekvenciranja, za izvođenje reakcije su potrebni matrica, DNK polimeraza, jedan prajmer, kao i smeša 2'- deoksiribonukleotid-trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Pored toga, u Sangerovoj metodi u reakciju se dodaje i jedan od 2',3'- dideoksiribonukleotid-trifosfata 64 (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP), dok se kod *Dye-terminator* sekvenciranja dodaje smeša ovih nukleotida koji su fluorescentno obeleženi različitim bojama. Na ovaj način je omogućeno da se sekvenciranje odvija u jednoj reakciji,

DNK polimeraza po principu komplementarnosti na određenoj poziciji nasumično ugrađuje dNTP ili ddNTP. Nakon ugradnje ddNTP-a, usled nedostatka 3' hidroksilne grupe na ddNTP-u, onemogućena je ugradnja sledećeg nukleotida u taj molekul DNK i taj fragment ostaje obeležen fluorescentnom bojom na ddNTP-u na svom 3' kraju. Nakon reakcije sekvenciranja dobija se smeša fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima sadrže bojama obeležene ddNTP.

Reakcija sekvenciranja pripremana je upotrebom *BigDye Terminator Ready Reaction* kita (*Applied Biosystems*, USA). Kao matrica za ovu reakciju dodaje se prečišćeni PCR produkt čiju sekvencu treba odrediti, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji.

Pre dalje analize na automatskom sekvenatoru, produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavni od ostataka fluorescentno obeleženih ddNTP-ova. Ovim se sprečava interferiranje fluorescentnog signala sa neugrađenih ddNTP-ova sa onim koji potiče sa sekvence ciljnog DNK molekula.

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani etanol/Na-acetat precipitacijom. U prisustvu soli i etanola DNK fragmenti precipitiraju iz vodenog rastvora dok u supernatantu ostaju neugrađeni ddNTP-ovi, koji se uklanjaju. Preostali talog prečišćenih obeleženih DNK fragmenata rastvara se u dejonizovanom formamidu, i denaturiše. Time se omogućava da DNK fragmenti ostanu u jednolančanoj linearnoj formi, što je neophodno da bi se tokom kapilarne elektroforeze fragmenti razdvajali prema dužini.

Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja vršena je na automatskom sekvenatoru ABI3500 (*AppliedBiosystems*, SAD). Tokom kapilarne elektroforeze "sirovi" podaci (eng. Raw data) prikupljeni su 3500 Data collection softverom, a zatim su obrađeni u Sequencing Analysis v5.3.1 softveru (*AppliedBiosystems*, SAD). Ovako dobijene sekvence se analiziraju, odnosno porede se sa referentnim sekvencama koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>). Poređenje je vršeno pomoću Sequencher 4.10.1 Demo softvera (*Gene Codes Corporation*, SAD).

Sve detektovene promene su pretraživane u nekoliko baza podataka kako bi se utvrdilo da li su već opisane u literaturi i kakav je njihov uticaj na nastanak bolesti. Dve najveće baze podataka koje su korišćene su dbSNP v145

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i HGMD (eng. The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.org>).

### **3.2.5. Fragmentna analiza**

Kapilarna elektroforeza fluorescentno obeleženih i denaturisanih PCR produkata vršena je na aparatu ABI3500 (*AppliedBiosystems*, SAD).

Prikupljanje „sirovih“ podataka (eng. Raw data) kao i kontrola celog procesa elektroforeze izvršena je uz pomoć 3500 Data Collection softvera (*AppliedBiosystems*, USA). „Sirovi“ podaci su dalje obrađivani u GeneMapper v4.1 softveru (*AppliedBiosystems*, USA). Podaci o dužinama fragmenata su dobijeni njihovim poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina.

## **3.3. ANALIZA SOCIODEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA ISPITIVANIH PACIJENATA**

Klasifikacija pacijenata obavljenja je na osnovu nalaza genetskog testiranja. Od ukupog broja ispitanih ALS pacijenata, 37 je imalo verifikovanu genetsku mutaciju, 17 sa familijarnim oblikom i 20 sa genskim oblikom bolesti. Ostali ALS pacijenti, njih 32, bez verifikovane mutacije, uvršteni su u kontrolnu „negenetsku“ grupu. Ovo je bila samo jedna grupa kontrole jer su u različitim delovima istraživanja različite grupe ispitanika poslužile kao kontrolna grupa o čemu će biti reči u odgovarajućim segmentima ovog poglavlja. Genetska grupa od 37 ispitanika poređena je sa 32 sporadična ALS pacijenta bez verifikovane mutacije u navedenim genima. Obe grupe ispitanika su bile uparene po polu, načinu početka bolesti i ALSFRS-r skor.

Nakon strukturisanog razgovora sa ispitanikom i članovima njegove uže porodice ili negovateljem, lekar je za svakog pacijenta popunjavao opšti upitnik. Na ovaj način dobijeni su sociodemografski podaci o pacijentu: pol, starost, komorbiditeti i mestu življenja. Pored toga, intervjuom su dobijeni značajni podaci o samoj bolesti: uzrast u početku ALS, prvim simptomima bolesti (početak), dijagnostičkom kašnjenju (vreme od pojave prvih simptoma bolesti do postavljanja dijagnoze), trajanje bolesti do

momenta ispitivanja i prisutvo ALS, Alchajmerove bolesti, FTD ili Parkinsonove bolesti kod članova najuže porodice i najbližih rođaka.

Svi pacijenti su pregledani od strane neurologa i evidentiran je ALSFRS-r skor na početku bolesti. Za određeni broj ispitanika pojedine ispitanima ALSFRS-r skor je određen retrospektivno na osnovu kliničkog neurološkog nalaza i anamnestičkih podataka iz istorije bolesti. Na osnovu podataka iz baze i neurološkog pregleda određivana je klinička forma na početku bolesti; pacijenti su podeljeni u četiri grupe: sa spinanim, bulbarnim, respiratornim i početkom bolesti kao demencija. Na osnovu lokalizacije inicijalnog simptoma bolesti pacijenti su podeljeni na pacijente sa početkom bolesti na gornim ekstremitetima, donjim ekstremitetima i pacijente sa bulbarnim početkom bolesti. Takođe ukoliko je početak bolesti bio na ekstremitetima registrovana je inicijalna strana zahvaćenosti (levo/desno). Na osnovu primarnog neurološkog nalaza na početku bolesti pacijenti su klasifikovani u tri grupe: istovremena prisutna zahvaćenost i GMN i DMN, predominantno zahvaćenost GMN ili predominantno zahvaćenost DMN. Anamnestički i klinički evidentirani su podaci i o atipičnim kliničkim simptomima i znacima u okviru ALS: objektivnim senzitivnim smetnjama i sfinkterijalnim smetnjama.

Kod svih pacijenata obavljena su kompletna biohemijska ispitivanja i analizirani su: nivoi glikemije, ukupnog holestreola, HDL i LDL frakcije holestreola, triglicerida, uree, kreatina, koncentracije hlorida u serumu. Referentne vrednosti za navedene laboratorijske parametre prikazane su u tabeli u rezultatima.

Indeks telesne mase izračunavan je (BMI, *body mass index*) kao količnik telesne mase i kvadrata visine izraženo u kg/m<sup>2</sup>. Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO), normalna vrednost BMI kreće se u rasponu između 18,5 i 25,0 kg/m<sup>2</sup>, osobe sa vrednostima ispod 18,5 kg/m<sup>2</sup> smatraju se neuhranjenim, dok osobe sa BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup> imaju prekomernu telesnu masu, a oni sa BMI preko 30 kg/m<sup>2</sup> označavaju se kao patološki gojazni (World Health Organization 2004)

Svim pacijentima je urađeno ispitivanje disajne funkcije. Normalnim su smatrane vrednosti FVC veće od 90% u odnosu na očekivane, blago sniženje FVC podrazumevalo je vrednosti između 70% i 90%, dok se pod respiratornom insuficijencijom smatrala vrednost FVC manja od 70%. Takođe, ispitivani su forsirani

ekspiratorni volumen u prvoj sekundi, kao i snaga respiratornih mišića merenjem maksimalnog inspirijumskog i ekspirijumskog pritiska (Pimax i Pemax). Vrednosti ovih indeksa manjih od 80% od predviđenog evedentirane su kao slabost inspirijumskih i/ili ekspirijumskih respiratornim mišića.

Svim pacijentima je urađen standardni elektromiografski pregled sa elektroneurografijom senzitivnih i motornih nerava, kao i EMG nalaz po protokolu za bolest motornog neurona. EMNG je izvođen na Oxford Synergy aparatu. Na osnovu EMG nalaza u skladu sa predloženim El Escorial kriterijumima pacijenti su svrstani u tri grupe: definitivna, verovatna i moguća. EMNG ispitivanje je rađeno po standardnom protoklu ispitivanja prisustva aktulne neurogene lezije u 4 regiona tela: kranijalni, cervikalni, torakalni i lumbosakralni. Dijagnoza definitivne ALS je na osnovu EMNG nalaza postavljena ukoliko je aktulna neurogena lezija verifikovana u 3 i/ili 4 ispitana regiona, dijagnoza verovatne ALS u najmanje 2 od 4 ispitana regiona, a moguće ALS u jednom od ispitana 4 regiona. U kranijalnom regionu najčešće su ispitivani: *m. trapezius*, *m. sternocleidomastodeus*, *m. genioglossu*, *m. orbiculais oris*, *m. masseter* ili *m. mentalis*. Dovoljno je bilo verifikovati znake aktuelne neurogene lezije u jednom od ispitanih mišića. U cerviklanom regionu najčešće ispitivani mišići su bili: *m. deltoideus*, *m. biceps brachi*, prvi interosealni mišići, za dijagnostičkim minimum od 2 zahvaćena mišića sa aktuelnom neurogenom lezijom. Ukoliko sa jedne strane nije verifikovana ista, EMG se sprovodila na kontralateralnoj strani. U torakalnom segmentu najčešće ispitivani mišići u našoj laboratoriji su bili paraspinalni mišići, i bio je neophodan nalaz aktulne neurogene lezije. Moguće je ispitivati i *m. rectus abdominis* u cilju verifikovanja iste lezije u torakalnom segmentu. Na nivou lumbosakralnog segmenta najčešće ispitivani mišići su bili: *m. vastus lataralis* ili *medialis*, *m. tibilais anterior* i *m. gastrocnemius*, sa istim principima koji važi i za ispitane mišiće na gornjim ekstremitetima. Pored kvantitativnog ispitivanja zahvaćenih segmenta tela, neophodnost je bila asimetrija neurofiziološkog nalaza bez predominacije zahvaćenosti samo distalne i/ili proksimlane muskulature.

Većini pacijenata je urađene lumbalna punkcija, u cilju diferencijalno-dijagnostičkog algoritma.

Ukoliko su pacijenti zahtevali primenu mehaničke neinvazivne ventilacije (NIV) registrovan je period korišćenja iste, kao i vreme od početka bolesti do razvoja respiratorne insuficijencije koja bi zahteva primenu aparata.

Kod pacijenata koji su imala otežano gutanje i koji su imali indikacije za postavljanjem perkutane gastrostome (PEG) registrovan je moment plasiranja iste, od momenta početka bolesti.

### **3.4. NEUROPSIHOLOŠKO TESTIRANJE**

Neuropsihološko testiranje je sprovedeno kod 27 genetski potvrđenih ALS pacijenata (22 SOD1 pozitivna ispitanika, 5 SOD1 negativnih ispitanika pozitivnih na druge ALS gene) i 82 zdrave kontrole regrutovane među zaposlenima na Klinici za neurologiju i među zdravim volonterima, koji su imali negativnu ličnu i porodičnu anamnezu na ALS kao i na druge teške neurološke, psihijatrijske i somatske bolesti, koje bi mogle imati uticaja na rezultate testiranja.

U istraživanju je korišćena opsežna baterija klasičnih neuropsiholoških testova. Prednost primene klasičnih testova jeste bogato iskustvo neuropsihologa u radu sa njima, kao i njihova široka primena na različitim populacijama ispitanika, uključujući i pacijente sa ALS. Neuropsihološko testiranje je u proseku trajalo sat i po vremena, sa pauzom od pola sata. Kod pacijenta su primenjivani testovi za kognitivni skrining, procenu opšteg intelektualnog nivoa, pažnje, pamćenja, vizuospacijalnih i konstrukcionih, egzekutivnih i jezičkih funkcija (Tabela 9).

Za testove su korišćene norme detaljno navedene u daljem tekstu, koje su dobijene na velikom uzorku zdravih osoba i koje se godinama unazad uspešno primenjuju i na našoj populaciji.

#### **3.4.1. Primenjivani testovi**

Za kognitivni skrining su primenjivani različiti testovi koji su prikazani u Tabeli 9.

*Mini Mental State Examination* (MMSE) (Folstein et al. 1975), je prvobitno osmišljen kao test za procenu težine demencije, ali se zbog svoje jednostavnosti i



kratkoće koristi kao vrlo korisno i jednostavno sredstvo procene intelektualnih sposobnosti u neurologiji i psihijatriji. Skor manji od 24 od ukupno 30 ukazuje na prisustvo kognitivnog pada (Pavlović et al. 2003).

Tabela 9. Neuropsihološki testovi primenjivani za ispitivanje pojedinih funkcija

Kognitivni skrining
Mini Mental State Examination (MMSE)
Opšti intelektualni nivo
Raven-ove standardne progresivne matrice (RSPM)
Pažnja
Trail Making Test A (TMT-A)
Wechsler-ov individualni test inteligencije (VITI) – Brojevi
Vizuospacijalne i vizuokonstruktorne sposobnosti
Rey-Osterrieth-ova složena figura (ROCF) - kopiranje
Pamćenje
Rey-ov test verbalnog učenja (RAVLT)
Rey-Osterrieth-ova složena figura (ROCF) - prisećanje
Egzekutivne funkcije
Trail Making Test B (TMT-B)
Testom kontrolisanih usmenih asocijacija reči (SKL)
Test kategorijalne fluentnosti (KF)
Wisconsin-ski test sortiranja karata (WCST)
Stroop test
Test za procenu jezičke funkcije
Boston-ski test imenovanja (BNT)

Za procenu opšteg intelektualnog nivoa korišćene su Ravenove standardne progresivne matrice (RSPM) (Raven 1960) (*Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised*, WAIS-R) (Wechsler 1981, Pavlović 2003). RSPM je test koncipiran da

procenjuje opštu intelektualnu sposobnost bez uticaja kulturoloških faktora i smatra se najčistijom, ali ne i idealnom merom opšteg faktora inteligencije (faktor G po Spearmanu). Prednost RSPM je da ne zahteva verbalizaciju, angažovanje motorike ili složene vizuospacijalne analize. Mada se za ovaj test ne daje vremensko ograničenje, kod svakog ispitanika je primenjivan najmanje 40 minuta, a najduže sat vremena. Dobijeni skorovi su konvertovani u percentile u odnosu na starost pacijenata i patološkim je smatran skor ispod 25. percentila (Burke 1985).

Za ispitivanje pažnje u studiju su korišćeni Trail Making Test A (TMT-A) (Reitan et Wolfson 1993) i test poznat kao *Brojevi*, za srpsku populaciju, standardizovane verzije Wechslerovog individualnog testa inteligencije (*Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised*, WAIS-R) (Wechsler 1981, Pavlović 2003). TMT-A procenjuje uglavnom pažnju, odnosno koncentraciju, ali i vizuelno opažanje, vizuospacijalnu procenu i vizuomotorne sposobnosti. Skor na TMT-A predstavlja vreme u sekundama za koje se kompletira zadatak. Za patološki nalaz uzeto je vreme koje za jednu i po standardnu devijaciju prevazilazi srednju vrednost norme za određenu starost (Spreen et Strauss 1991). Testom *Brojevi* meri se verbalna pažnja i neposredno verbalno upamćivanje te je on osetljiviji na oštećenje leve hemisfere, nego desne ili na difuznu leziju. U analizu su uključene sledeće varijable: ukupan skor na ponavljanju niza brojeva unapred, kao i unazad te najduži tačno ponovljeni niz unapred i unazad prezentovanih brojeva (Pavlović 2003).

Vizuospacijalne funkcije ispitivane su kopiranjem Rey-Osterriethove složene figure (ROCF) (Rey 1941, Osterrieth 1944) Kopiranje ROCF je test za procenu vizuokonstrukcionih sposobnosti u dve dimenzije i njegova primena traje oko deset minuta. Zadata figura se sastoji od elemenata koji se ne mogu lako verbalno kodirati čime se smanjuje uticaj leve hemisfere. Pored toga, u kopiranju ROCF uključeni su i desni i levi frontalni i parijetookcipitalni regioni, a lokalizacija lezije se najpre može utvrditi analizom kvalitativnih grešaka. Kvantitativnom patološkom vrednošću je smatran skor koji je bio za jednu i po standardnu devijaciju manji u odnosu na srednju vrednost za odgovarajući uzrast (Spreen et Strauss 1991).

Za ispitivanje verbalnog pamćenja korišćen je Reyov test verbalnog učenja (RAVLT) (Rey 1964), a za procenu neverbalnog pamćenja crtanje po sećanju ROCF trideset minuta nakon kopiranja (Rey 1941, Osterrieth 1944). RAVLT je u našem

istraživanju korišćen za ispitivanje neposrednog upamćivanja određivanjem ukupnog skora svih pet ponavljanja liste reči, kao i za ispitivanje rekognicije. RAVLT je osetljiv na oštećenja leve (dominantne) hemisfere. Pri tome, kod pacijenta sa temporalnom lezijom uočava se pad na svim skorovima, dok je kod pacijenata sa frontalnom lezijom, prepoznavanje očuvano u odnosu na spontano prisećanje. Normativne vrednosti za RAVLT zavise od pola i starosti ispitanika i patološkim rezultatom smatran je skor koji je bio jednu i po standardnu devijaciju ispod normativne vrednosti (Geffen et al. 1990, Pavlović 2003). Crtanje po sećanju ROCF je test za procenu prostornog pamćenja. Kao i pri kopiranju figure, u prisećanje su uključene obe hemisfere.

Egzekutivne funkcije su ispitivane primenom Trail Making Testa B (TMT-B) (Reitan et Wolfson 1993), testom kontrolisanih usmenih asocijacija reči (SKL) (Lezak et al. 1995), testom kategorijalne fluentnosti (KF) (Goodglass et Kaplan 1983) i Wisconsinским testom sortiranja karata (WCST) (Heaton et al. 1981). TMT-B pored funkcija koje procenjuje TMT-A, ima ulogu i u proceni kompleksnog konceptualnog praćenja koje spada u egzekutivne funkcije. Skor na TMT-B predstavlja vreme u sekundama za koje se kompletira zadatak. Za patološki nalaz smatrano je vreme koje je od norme veće za jednu standardnu devijaciju za određenu starost (Spreen et Strauss 1991). SKL test meri fonemsku fluentnost, tj. produkciju pojedinačnih reči na zadato slovo (u srpskom jeziku S, K i L) u toku jednog minuta, kao i verbalno divergentno mišljenje. Test je prvenstveno osetljiv na disfunkciju leve velikomoždane hemisfere. Kao granična vrednost u našem govornom području uzima se 21 poen (Pavlović 2003). Korišćen je i test KF, koji podrazumeva nabrojanje životinja u toku jednog minuta, a preuzet je iz Bostonskog testa za ispitivanje afazija (BDAE). Ovim testom se meri kategorijalna fluentnost, odnosno verbalno divergentno mišljenje. Za patološku vrednost smatran je broj reči za jednu standardnu devijaciju manji u odnosu na normu za starost (Pavlović 2003). WCST je odličan test za ispitivanje načina na koji se rešavaju problemi, za otkrivanje perseverativnosti i mentalne rigidnosti (sposobnosti promene i održavanja seta). Za potrebe našeg istraživanja analiziran je broj postignutih kategorija, tj. nizova od deset tačnih odgovora, kao i broj perseverativnih odgovora i broj neuspešnih pokušaja održavanja seta. WCST smatra se uglavnom merom funkcije frontalnih režnjeva, ali nema usaglašenih stavova o uticaju strane lezije na postignuće na ovom testu. Patološkim je smatran ostvareni broj kategorija, broj perseverativnih odgovora i

neuspelih pokušaja održavanja seta manji za jednu i po standardnu devijaciju, u odnosu na prosečnu vrednost odgovarajuće grupe zdravih ispitanika (Spreen et Strauss 1991).

Za ispitivanje jezičkih funkcija korišćen je Bostonski test imenovanja (BNT) (Kaplan et al. 1978). Ovaj test je dobar za otkrivanje disnomije, ali zavisi i od očuvanosti vizuelne percepcije. Kod osoba sa lezijom desnog frontalnog režnja, može da se javi fragmentarno opažanje.

Za ispitivanje egzekutivnih sposobosti u istraživanju je korišćen Stroop-ov test (Pavlović, 2003). Ovaj test meri sposobnost promene perceptivnih setova, odnosno prisustva ili odsustva kognitivne inertnosti u zadacima gde se zadaci uslovi menjaju, provocirajući uobičajeni odgovor nasuprot neuobičajenom. Regstruje se vreme za koje je ispitanik završio zadatak kao i broj grešaka u tri podzadatka. Stroop test se sastoji od tri bele karte od kojih svaka ima deset redova sa po pet elemenata. Prvi deo zadataka podrazumeva čitanje imena boja sa prve karte odštampanih crnim mastilom; drugi deo – imenovanje boja tačaka odštampanih na drugoj karti; u trećem delu zadatka od ispitanika se zahteva da imenuje boje kojima su odštampane reči na trećoj karti zanemarujući njihov verbani sadržaj (npr. imenovati boju kojom je odštampana reč „plavo”). Test zahteva očuvanu sposobnost promene koncepta.

### **3.5. PREŽIVLJAVANJE**

Svi pacijenti su praćeni do smrtnog ishoda ili do 31. decembra 2016. godine. Podaci o toku i ishodu bolesti dobijeni su od strane pacijenata i njihovih članova porodice na regularnim posetama neurologu i/ili putem telefonskog poziva i elektronske pošte. Za preminule pacijente vreme do preživljavanja je definisano kao interval od početka bolesti do datuma smrti. Na osnovu matičnih brojeva pacijenata dobijena je iz Republičkog zavoda za statistiku lista pacijenata koji su preminuli, sa tačno registrovanim datumom smrtnog ishoda.

Za analizu preživljavanja je korišćena Kaplan-Meier-ova kriva pri čemu je početak bolesti definisan kao nulto vreme a vreme smrti kao krajnja tačka. Log-rank test je korišćen da se uporedi preživljavanje u dve grupe ispitanika. Multivarijantna regresiona analiza (Cox-ov metod) je korišćena da se ispita nezavisni uticaj

pojedinačnih sociodemografskih i kliničkih varijabli na preživljavanje. U multivarijantni model su uključene sve varijable koje su u univarijantnoj analizi bile povezane sa preživljavanjem sa nivoom statističke značajnosti od 0,05.

### **3.6. NEURORADIOLOŠKO ISPITIVANJE - MAGNETNA REZONANCA**

Od 69 pacijenata sa ALS, MR pregledom mozga i vratnog dela kičmene moždine je obuhvaćena grupa od 23 genetski determinisanih pacijenata i 11 iz grupe sporadične ALS. Od 23 pacijenta iz grupe genetski definisane bolesti 15 je imala familijarni, a osam je imalo genetski determinisanu formu bolesti. Kontrolna grupa bila je sastavljena od 34 zdrava ispitanika uparena po polu i starosti sa pacijentima.

#### **3.6.1. Tehnički parametri MR**

MR pregled obavljen je korišćenjem aparata Philips Medical System Achieva jačine 1.5 Tesla. Dobijene su sledeće sekvence MR mozga: (i) dual-eho turbo (DE) spin-eho (vreme ponavljanja [TR]=3125 ms, eho vreme [TE]=20/100 ms, dužina eho voza=6, 44 aksijalnih preseka, debljina=3 mm bez razmaka, veličina matrice=256×247, vidno polje [FOV]=240×232 mm<sup>2</sup>); (ii) trodimenzionalni (3D) sagitalni T1-weighted Turbo Field Echo (TFE) (frekvencijski pravac=anteriorno-posteriorni; TR=7.1 ms, TE=3.3 ms, inverziona vreme [TI]= 1000 ms, ugao=8°, veličina matrice=256×256x180 [inferiorno-superiorno, anteriorno-posteriorno, levo-desno], FOV=256×256 mm<sup>2</sup>); (iii) pulsed gradient spin echo (SE) single shot echo-planar (TR=6715 ms, TE=86 ms, ugao=90°, veličina matrice=112×110, FOV=224×220 mm<sup>2</sup>; 50 aksijalnih preseka, debljina=2.6 mm bez razmaka), sa gradijentima kodiranja difuzije primenjenim u 65 nekolinearnih pravaca, što je izabrano kao podrazumevano na skeneru (b faktor= 1000 s/mm<sup>2</sup>; sedam proseka). Maksimalna amplituda difuzionog gradijenta iznosila je 33 mT / m, a za prijem signala korišćen je višenamenski navoj glave; and (iv) gradient-echo (GRE) echo planar imaging (EPI) za funkcionalni MRI (fMRI) u stanju mirovanja (RS) (TR=3000 ms, TE=35 ms, ugao=90°, veličina matrice=128x128, FOV=240 x 240 mm<sup>2</sup>; debljina preseka=4 mm, 200 komada od po 30 susednih aksijalnih preseka). Ukupno vreme dobijanja RS fMRI je bilo oko 12 minuta. Tokom snimanja, pacijentima je

naloženo da se ne pokreću i da budu zatvorenih očiju. U toku iste serije snimanja, dobijene su sledeće MR sekvence cervikalne kičme: (i) Short-time inversion recovery (STIR) (FOV=250 mm<sup>2</sup>, 11 sagitalnih preseka, debljina preseka=3 mm, veličina matrice=276×276, TR=2500 ms, TE=70 ms, TI=165 ms); (ii) 3D sagittal high resolution T1-weighted Fast Field Echo (FFE) (FOV=220×220×106 mm<sup>3</sup>, veličina matriksa=200×200, TR=25 ms, TE=9.2 ms), (iii) 3D magnetizacioni transfer (MT) GRE (FOV=230×230×100 mm<sup>3</sup>, 40 aksijalnih preseka, veličina matrice=256×209, TR=37 ms, TE=4.3 ms).

### **3.6.2. Analiza mozga na MR**

#### **3.6.2.1. Debljina korteksa**

Kortikalna rekonstrukcija i procena debljine korteksa izvršena je na 3D T1-ponderisanim TFE slikama pomoću FreeSurfer analizatora slika, verzija 5.3 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) (Desikan RS et al., 2006). Nakon registracije u prostoru Talairach i normalizacije intenziteta, izvršeno je automatsko uklanjanje lobanje, čime se razdvajaju ekstracerebralne strukture, mozak i moždano stablo, koristeći hibridnu metodu koja kombinuje algoritme sliva i modele deformabilne površine. Slike su zatim pažljivo proverene za greške u uklanjanju lobanje, a podeljene su u sivu masu (SM), belu masu (BM) i cerebrospinalnu tečnost (CST). Tada su cerebralne hemisfere razdvojene, a subkortikalne strukture odvojene od kortikalnih komponenti. Granica BM / SM je bila spojena i površina je deformisana prema gradijentu intenziteta kako bi se optimalno postavile granice BM / SM i SM / CST, čime se dobijaju površine BM i pije mater. Rezultati ove segmentacione procedure su vizuelno pregledani, a po potrebi i ručno uređeni dodavanjem kontrolnih tačaka. Nakon toga, izvedena je površinska inflacija i registracija na sferni atlas, a cerebralni korteks je podeljen u 34 regiona po hemisferi, na osnovu giralnih i sulkalnih struktura, kako su opisali Desikan i saradnici. Konačno, debljina korteksa procenjena je kao prosečna najkraća razdaljina između granice BM i površine pije mater.

#### **3.6.2.2. Mikrostruktura puteva bele mase**

Podaci o difusion-weighted (DWI) slikama su dobijeni alatom za ekstrakciju (BET) sadržanom u FSLv5.0 (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl>). DWI snimci su korigovani

za distorzije uzrokovane vrtložnim strujama i pokretima pacijenta, koristeći implementaciju algoritma opisanog u Rohde et al. 2004. Tenzor difuzije (DT) je procenjen voksel po voksel koristeći DTIfit programa, deo FMRIB diffusion programa, u okviru FSL, kako bi se dobila frakciona anizotropija (FA), srednja difuzivnosti (MD), aksijalna (akD) i radijalna mapa difuzivnosti (radD). Traktografije kortikospinalnih puteva i korpusa kalozuma (celi trakt, kao i genu, telo i splenijum) definisane su u prostoru Montrealskog neurološkog instituta (MNI) na FA obrascu koji je obezbedio FSL. Svi putevi (traktografija) registrovani su na DT MRI sekvenci pomoću algoritma verovatnoće implementiranog u FSL (probtrackx), koji se temelji na Bayesovim procenama difuzije parametara (Bedpostx). Svi delovi puteva su „praćeni“ od početnog vokselu unutar difuzije za generiranje neophodnih 5000 uzoraka koji se pojednostavljaju s dužinom koraka od 0,5 mm i pragom zakrivljenosti od 0.2mm. Mape puteva su zatim normalizovane uzimajući u obzir broj vokselu. Broj linija prezentovan u vokselima puteva podeljen je sa ukupnim putem što odgovara broju linija koje nisu odbačene ekskulizacijom maskom. Dobijeni putevi su bili podeljeni vrednošću koja je jednaka 40% od 95. percentila raspodele vrednosti intenziteta vokselu uključenih u trakt. Ova normalizaciona procedura je omogućila da se isprave moguće razlike između puteva zbog različitih početnih veličina. Na ovaj način smo isključili i pozadinski šum i izbegli previše restriktivnu segmentaciju kada je maksimalna vrednost intenziteta bila izvan. Koristeći "seed" pristup dobijene su rekonstrukcije puteva od interesa. Za svaki trakt, izračunate su srednje vrednosti FA, MD, axD i radD.

### **3.6.2.3. Funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja**

Funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja (fMRI)- ova analiza je izvedena pomoću kompjuterskog programa FSL (FSLv5.0) (Filippini N et al., 2009). Preprocesiranje je izvršeno korišćenjem FEAT 7-9 i uključeno je: (i) uklanjanje prvih četiri volumena kako bi se omogućilo uravnoteženje signala; (ii) korekcija kretanja glave pomoću podešavanja volumena na srednji volumen koristeći korekcijski program MCFLIRT; (iii) globalni 4D srednji intenzitet normalizacije; i (iv) prostorno pomicanje (5 mm FWHM). Zatim smo primenili ICA-AROMA (automatsko uklanjanje pokretnih artefakata na osnovu analize komponenti) kako bi se identifikovale one nezavisne komponente koje predstavljaju artefakte povezane sa kretanjem. Ovaj metod izračunava skup prostornih i vremenskih diskriminativnih karakteristika i, prema njima, eksploatiše

postupak klasifikacije za identifikaciju IC koji predstavljaju artefakte pokreta. Konkretno, ove osobine procenjuju prostorno preklapanje svake komponente sa ivicama mozga i likvora i frekventni sadržaj i vremensku korelaciju sa parametrima promene IC vremenske serije. Konačno, IC klasifikovani kao povezani sa pokretom su uklonjeni sa fMRI skupa podataka pomoću linearne regresije. Rezultat baze fMRI je bio filtriran visokopropusnim filterima (cut-off frekvencija od 0.01 Hz) i ko-registrovan na T1-weighted TFE sliku koristeći registraciju zasnovanu na granici, kao što je implementirana u FLIRT( alat za registraciju linearne slike) i naknadno transformisana u MNI152 standardni prostor sa izotropskom rezolucijom od 4 mm koristeći nelinearnu registraciju kroz FNIRT. Prethodno obrađeni fMRI podaci, koji sadrže 196 vremenskih poena za svaki subjekt, privremeno su bili povezani preko subjekta kako bi se stvorio jedan 4D skup podataka. Ovaj FMRI skup podataka je zatim razgrađen u IC sa slobodnom procenom za broj komponentata koji koriste MELODIC (Multivariate Ekploratori Linear Optimized Decomposition in Independent Components) (Beckmann CF & Smith SM, 2004).

#### **3.6.2.4. Analiza kičmene moždine pomoću MR**

Mape magnetksoog transfer odnosa (MTR) dobijene su piksel po piksel, prema jednačini:  $MTR = (M0-MS) / M0 \times 100\%$ , pri čemu je M0 intenzitet signala za određeni piksel bez impulsa zasićenja, a MS je intenzitet signala za isti piksel kada se primeni impuls zasićenja. E-grafik prikazuje MTR mapu pacijentove kičmene moždine, koja je predstavnik opšteg kvaliteta podataka, bez pulsativnog kretanja kičmene moždine i CST. Metoda aktivne površine, primenjena je na 3D T1-weighted slikama i MTR mapama kod svakog pacijenta radi procene površine i centralne linije kičmene moždine u obe slike. Inicijalna procena centralne linije kičmene moždine ručno je dobijena postavljanjem znakova u krajnjim regionima kičmene moždine (gornja granica: najkranijalni deo na kojem je odontoidni nastavak epistrofeusa vidljiv u obe sekvence, donja granica: deo koji je prošao kroz donju granicu C7 u 3D T1-weighted slikama i C5 u MTR mapama), a zatim oko svakih 10 mm između ovih orijentira. Jedan operater izvršio je postavljanje svih orijentira. Centralna linija kičmene moždine i ivične linije na svakom preseku su automatski izračunati korišćenjem segmentacionog algoritma sa stalnim povećanjem preciznosti modela aktivne površine koja opisuje ivice kičmene moždine. Ova segmentaciona procedura je primenjena na obe MRI sekvence kičmene



moždine dvaput: prvo, da bi se dobila prava kičmena moždina iz 3D T1 i MTR skenova (čime se poboljšava korespondencija anatomskih orijentira između dve slike); drugo, da se izračuna ivica kičmene moždine i kvantitativne mere na ravnim snimcima. Srednji deo poprečnog preseka cervikalne kičmene moždine (*cross section area-CSA*) meren je na 3D T1-weighted sekvenci, jer je volumen kičmene moždine podeljen sa dužinom kičme (Horsfield MA et al., 2010). Štaviše, CSA je regionalno procenjen na definisanim anatomskim orijentirima (tj. odeljcima koji prolaze kroz donje granice C2, C3, C4, C5, C6 i C7). Slično tome, prosečni MTR je izračunat u okviru ivice kičmene moždine na definisanim anatomskim orijentirima (tj. segmentima koji prolaze kroz donje ivice C2, C3, C4 i C5).

### **3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Statistička obrada podataka je vršena u programu SPSS verzija 20.0 (SPSS Inc, Čikago, Illinois, SAD). Sve ispitivane varijable su prvo analizirane pomoću srednjih vrednosti Q-Q plot, Shapiro-Wilks-ovog i Kolmogorov-Smirnov testa da bi se utvrdilo da li se distribuišu po normalnoj raspodeli. Od parametara deskriptivne statistike korišćeni su proporcija, srednja vrednost i standardna devijacija (SD).

Za poređenje nominalnih i ordinalnih varijabli između dve ili tri grupe ispitanika korišćen je  $\chi^2$  test ili Fisherov test tačne verovatnoće u zavisnosti od dimenzija tablice kontigencije i broja očekivanih slučajeva u tablici. Značajnost razlike kontinuiranih neparametarskih varijabli između dve grupe ispitanika je ispitivana pomoću Mann-Whitneyevog U testa, a razlika kontinuiranih parametarskih varijabli pomoću Student-ovog t testa. Za poređenje tri grupe ispitanika korišćena je parametarska ANOVA sa post hoc analizom (Bonferronijeva korekcija) ili neparametarska ANOVA (Kruskal-Wallis), u zavisnosti od toga da li su podaci bili distribuisani po normalnoj raspodeli. Korelacije dvaju varijabli su ispitivane Spearman-ovim koeficijentom korelacije ranga.

Kaplan-Meier-ova kriva je korišćena za analizu preživljavanja, pri čemu je kao nulto vreme korišćen trenutak pojave prvih simptoma ALS dok je smrtni ishod definisan kao tačka ishoda. Log-rank test je primenjen za poređenje razlika između dve grupe. Za

procenu nezavisnog uticaja svake promenljive na preživljavanje korišćena je multivarijantna regresiona analiza (Cox proporcionalni regresioni model).

Razlike u zapremini sive mase mozga dobijene metodom VBM kod različitih grupa ispitanika, analizirane su pomoću softvera SPM8 korišćenjem analize kovarijanse uz prilagođavanje za starost i ukupnu intrakranijalnu zapreminu. Za poređenje rezultata dobijenih pomoću DTI korišćen je softver za interferenciju zasnovanu na permutaciji koji služi za neparametarsku pragovnu statističku analizu, a deo je FMRIB softverske biblioteke (FSL) (Nichols et al. 2002). Broj permutacija je podešen na 5000 (Nichols et al. 2002). DTI vrednosti na skeletu bele mase poređene su među dvema grupama pomoću t testa zasnovanog na permutaciji uz korekciju za starost ispitanika. Za analizu povezanosti kliničkih i kognitivnih varijabli sa atrofijom sive mase i promenama bele mase, korišćen je regresioni model iz SPM8 (korigovan za starost i ukupnu intrakranijalnu zapreminu) i FSL (korigovan za starost). Da bi se smanjio broj poređenja, axD i radD nisu uključene u korelacionu analizu.

Poređenje rezultata fMR u stanju mirovanja sprovedeno je pomoću dvojne regresione tehnike implementirane u FSL. Nakon dualne regresije, prostorne mape svih ispitanika su prikupljene u jedan četvorodimenzionalni fajl za svaku originalnu nezavisnu komponentu. Poređenje je potom izvršeno preko neparametarskog permutacionog testa. Pored toga, rađena je i analiza regiona od interesa za dalju analizu mreža povezanosti. Sve analize su korigovane za trajanje bolesti analizom kovarijanse.

Nivo značajnosti za sve statističke analize bio je 0,05 za statistički značajnu razliku i 0,01 za visoko statistički značajnu razliku. Za analizu podataka dobijenih pomoću MR, izvršena je korekcija statističke značajnosti za višestruka poređenje pomoću metode family-wise error.

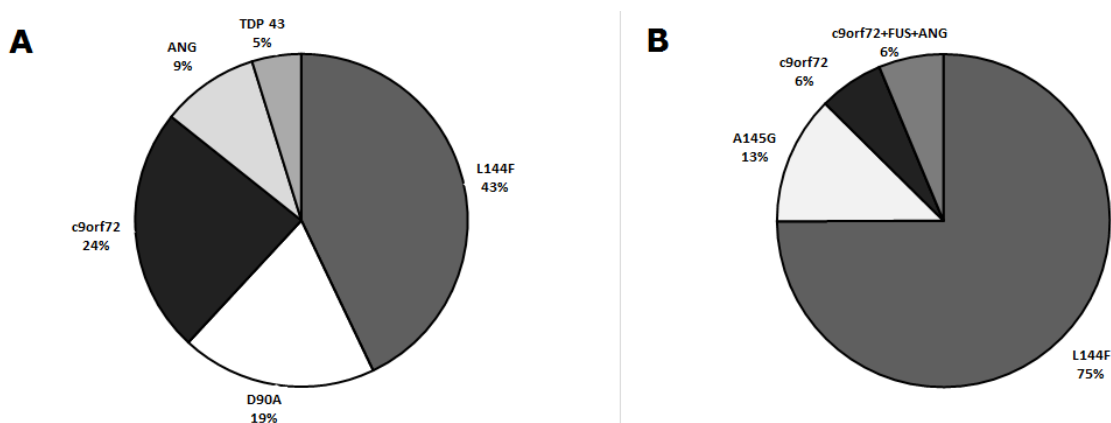
## 4. REZULTATI

### 4.1. SOCIODEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA GENETSKOM ALS

#### 4.1.1. Grupna analiza

Ukupno 37 (15,4%) od 241 pacijenta imalo je jednu ili više mutacija u testiranim ALS genima. Od 241 ispitanog pacijenta 17 (7.1%) je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS, a 224 (92.9%) pacijenta je bilo bez pozitivne porodične anamneze za ALS. Kod 17 pacijenata, iz 16 porodica, registrovana je jedna mutacija u genima povezanim sa ALS. Dva pacijenta iz grupe familijarne ALS su bila iz iste porodice. Samo jedan pacijent je imao pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS, ali nije bio nosilac mutaciju ni u jednom od testiranih ALS gena. Dvadeset jedan (9,4%) od 224 očigledno sporadična pacijenta bio je genetski pozitivan, tako da je svaki od njih definisan kao genetski ALS pacijent. Jedan pacijent iz ove grupe imao je pozitivnu porodičnu anamnezu za nespecifičnu demenciju. Nakon dobijenih rezultata formirane su dve grupe ispitanika: prvu grupu je činilo 37 genetski definisanih pacijenata (15,4%), od kojih 16 sa familijarnom formom ALS (FALS), a 21 sa sporadičnom genetski definisanom formom bolesti (Grafikon 1. Tabela 10).

Grafikon 1. Distribucija različitih mutacija među genetički pozitivnim ALS pacijentima



A – sporadični genetski definisani ALS pacijenti (n=21); B - familijarni ALS pacijenti (n=16)

Tabela 10. Rezultati genetskog testiranja kod pacijenata sa familijarnim i očigledno sporadičnim ALS u srpskoj populaciji

	Svi ALS pacijenti  Ukupan broj (%)	Očigledno sporadični ili sporadični ALS  Ukupan broj (%)	Familijarni ALS  Ukupan broj (%)	P†
<b>Genetski pozitivni</b>	37 (15.4%)	21 (9.4%)	16 (94.1%)	<b>p&lt;0.01</b>
<i>SOD1 pozitivni</i>	27 (73.0%)	13 (61.9%)	14 (87.5%)	p=0.14
L144F	21 (56.8%)	9 (42.9%)	12 (75.0%)	NA
D90A	4 (10.8%)	4 (19.0%)	0 (0%)	
A145G	2 (5.4%)	0(0%)	2 (12.5%)	
<i>SOD1 negativni</i>	10 (27.0%)	8 (38.1%)	2 (12.5%)	p=0.14
c9orf72	6 (16.2%)	5 (23.8%)	1 (6.3%)	NA
ANG	2 (5.4%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
TDP 43	1 (2.7%)	1 (4.8%)	0 (0%)	
c9orf72+FUS+ANG	1(2.7%)	0(0%)	1 (6.3%)	
<b>Genetski negativni</b>	204 (84.6%)	203 (90.6%)	1 (5.9%)	<b>p&lt;0.01</b>
<b>Σ</b>	241 (100%)	224(2.9%)	17 (7.1%)	

† kada se uporede očigledno sporadični ili sporadični ALS pacijenti vs. familijarni ALS pacijenti; NA= nije primenljivo; bolodvanim su označene statistički značajne razlike

Inicijalno je izvršena statistička analiza poređenja dve grupe pacijenata, onih sa i onih bez mutacije (Tabela 11). Obe grupe se statistički nisu razlikovale po polu, ishodu bolesti (statistički nije bilo značajne razlike između broja živih i umrlih pacijenata po grupama), kao ni po starosti na početku bolesti. Statistički značajna razlika ( $p<0.01$ ) uočena je u trajanju bolesti, koja je u grupi genetski potvrđenih pacijenta u proseku bila  $58,0\pm 53,7$  meseci, dok je kod sporadičnih iznosila  $36,0\pm 22,5$  meseci. Duže dijagnostičko kašnjenje evidentirano je u grupi genetski potvrđenih pacijenata ( $20,0\pm 22,5$  meseci). u poređenju sa pacijentima sa sporadičnom ALS ( $8,5\pm 9,2$  meseci) i ova razlika je bila statistički značajna ( $p<0.01$ ), što se može objasniti blažom kliničkom slikom i sporijom progresijom tegoba kod pacijenta prve grupe. U odnosu na početak bolesti (spinalni ili bulbari), nije registrovana statistički značajna razlika između grupa, s obzirom na predefinisane uslove istraživanja. Demencija kao inicijalni simptom

bolesti (po tipu bihevioralne varijante FTD) evidentirna je samo kod jednog pacijenta sa genetski potvrđenom bolesti i sa mutacijom u genu za ANG.

Tabela 11. Sociodemografske i kliničke karakteristike ALS pacijenata u našoj kohorti

ALS	Genetski	Sporadični	p
N	53.6%	46.4%	
Pol (% muškaraca)	56.8%	53.1%	0,762
Smrtini ishod (%)	37.8%	18.8%	0,081
Starost (godine)	58.0±11.1	57.4±12.3	0,678
Starost u vreme početka bolesti (godine)	52.0±11.3	53.5±9.8	0,415
Trajanje bolesti (meseci)	58.0±53.7	36.0±22.5	0,003*
Vreme od početka bolesti do dijagnoze	20.0±22.5	8.5±9.2	0,001*
Porodična anamneza			<0,001*
Negativna	54.1%	93.8%	
ALS	43.2%	3.1%	
AD	2.7%	3.1%	
Početak bolesti			
spinalni	89.2%	90.6%	
bulbarni	10.8%	9.4%	
Demencija kao inicijalni simptom (%)	2.7%	0.0%	
Glikemija ( $\bar{x}$ ±SD)	5.2±1.1	5.0±0.7	0,249
Lipidogram ( $\bar{x}$ ±SD)			
holesterol	5.2±1.1	5.8±1.1	0,095
HDL	1.6±0.4	1.6±0.5	0,250
LDL	3.4±0.9	3.6±1.1	0,236
trigliceridi	1.1±1.1	1.1±0.8	0,658
CI <sup>-</sup> ( $\bar{x}$ ±SD)	104.0±2.9	105.5±2.9	0,052*
Kreatinin ( $\bar{x}$ ±SD)	62.0±2.9	65.0±13.4	0,080
Urea ( $\bar{x}$ ±SD)	4.8±1.1	5.0±2.3	0,085
CPK( $\bar{x}$ ±SD)	140.0±185.7	180.0±239.9	0,213
BMI ( $\bar{x}$ ±SD)	24.2±3.3	24.2±4.1	0,741
Lokalizacija početka bolesti			0,666
Gornji ekstremiteti	21.6%	31.3%	
Gonji ekstremiteti	67.6%	63.8%	
Bulbarni region	10.8%	10.1%	
Lateralizacija (% desno)	63.6%	58.6%	0,686
Klinička slika			
GMN+DMN	81.1%	84.4%	
GMN	10.8%	9.4%	
DMN	8.1%	6.3%	
Objektivni senzitivni ispad (%)	43.2%	3.1%	<0,001*
Sfinkterijalne smetnje (%)	40.5%	6.3%	0,001*

Dizartrija/disfagija (%)	18.9%	25.0%	0,541
El Escorial kriterijumi			<0,001
Moguća	0.0%	12.5%	
Verovatna	0.0%	21.9%	
Sigurna	100.0%	65.6%	
EMG			
Negativan (nisu ispunjeni kriterijumi)	2.7%	0.0%	
Pozitivan broj regiona 1	8.1%	12.5%	
2	48.6%	21.9%	
3	32.4%	40.6%	
4	8.1%	25.0%	
Proteinorahija ( $\bar{x}\pm SD$ )	0.46 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ .13	0,175
Pimax ( $\bar{x}\pm SD$ )	37.4 $\pm$ 24.9	51.0 $\pm$ 20.1	0,008*
Pemax ( $\bar{x}\pm SD$ )	65.6 $\pm$ 32.6	74.3 $\pm$ 32.2	0,225
FEV1 ( $\bar{x}\pm SD$ )	89.0 $\pm$ 33.3	105.5 $\pm$ 18.2	0,007*
FVC ( $\bar{x}\pm SD$ )	93.0 $\pm$ 27.4	108.5 $\pm$ 17.3	0,001*
NIV (% koji su bili)	40.5%	40.6%	0,994
U vreme dijagnoze ALS FRS-r ( $\bar{x}\pm SD$ )	42.0 $\pm$ 6.2	43.0 $\pm$ 3.8	0,469
PEG (% da)	5.4%	16.7%	0,229
Parenhimski dopler mozga			
patološki	62.2%	41.7%	
normalan	37.8%	58.3%	
Terapija Rilutek® (%)	64.9%	89.5%	0,049*

\* statistički značajna razlika;  $\bar{x}\pm SD$  – srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija

Ispitivani su i određeni laboratorijski parametri, koji su u dosadašnjim istraživanjima pokazivali određene razlike kod sporadičnih i familijarnih oblika bolesti, ali u našem istraživanju nije dobijena statistički značajna razlika ni za jedan od ispitanih parametara (glikemija, holesterol HDL, LDL holesterol, trigliceridi, urea, kreatinin, CPK). Granična stistički značajna razlika od  $p=0.05$  dobijena je za koncentraciju jona  $Cl^-$  koja je bila viša u sporadičnoj grupi obolelih. BMI nije ukazao na statistički značajnu razliku kod dve ispitane grupe obolelih ( $p>0.05$ ).

Prema lokalizaciji početka bolesti, u genetskoj grupi je kod 67.6% ispitanika bolest počela na donjim ekstremitetima kod 21.6% na gornim ekstremitetima, i 10.8% ispitanika je imalo bulbarni početak bolesti, što ukazuje na dominantnost spinalnog početka kod 89.2% pacijenata u genetski determinanoj grupi. I u grupi pacijenata sa sporadičnom ALS predominantan je spinalni početak bolesti, ali poredjenjem sa geentskom grupom nije dokazana statistička značajnost ( $p>0.05$ ). Takođe, ukoliko je bolest imala spinalni početak, uočeno je značajno češći početak na desnim

ekstermitetima (63.6%, u odnosu na leve ekstremitete 36.4% obolelih), bez statistički značajne razlike ( $p > 0.05$ ). U kliničkoj slici u obe grupe najveći broj pacijenta je na početku bolesti ispoljio kliničku sliku oštećenja i GMN i DMN ( u genetskoj grupi 81.1% u sporadičnoj 84.4%, dok je predominaciju lezije GMN u genetskoj grupi imalo 10.8% ispitanika, a predominaciju lezije DMN 8.1% ispitanika). Atipični klinički znaci su bili češći u genetski determinanoj grupi ispitanika u odnosu na sporadične: objektivni senzitivni ispadi 43.2%:3.1%, sfinkterijalne smetnje 40.5%:,6,3% i ova razlika je bila statistički značajna ( $p < 0.01$ ). Znaci afekcija bulbarne muskulature na početku bolesti (dizartrija, disfagija) bili su prisutni kod svega 18.9% obolelih u genetski determinisanoj grupi obolelih.

Po revidiranim El Escorial kriterijumima (2015) u genetskoj grupi obolelih svi pacijenti su klasifikovani u grupu klinički definitivnih laboratorijski potvrđenih pacijenata jer su imali verifikovanu genetsku mutaciju. U sporadičnoj grupi obolelih pacijenata klinički definitivnu ALS imalo je 65.6% obolelih, verovatnu ALS 21.9%, a moguću ALS 12.5% ALS pacijenata. U grupi genetski determinisanih ALS, ukoliko se strogo poštuju raniji El Escorial kriterijumi samo je 27 (73%) pacijenata koji su bili nosioci SOD1 mutacija, ispunjavalo uslove za definitivnu ALS, jer mutacije u ostalim genima nisu još uvek zvanično uvrštene u El Escorial dijagnostičke kriterijume. Međutim, pre genetskih analiza pacijentima je urađena standardna neurofiziološka dijagnostika u sklopu algoritma ispitivanja bolesti. U genetskoj grupi ispitanika rezultati su bili sledeći: normalan EMG nalaz je imao jedan pacijent, zahvaćenost 1 regiona 3 pacijenta, zahvaćenost 2 regiona 18 pacijenta, dok je zahvaćenost 3 i/ili 4 regiona imalo 15 pacijenata na početku bolesti. To sugeriše da na osnovu EMG nalaza 22 (59.5%) klinički definitivna laboratorijski potvrđena ALS pacijenta bi imalo moguću ili verovatnu dijagnozu ALS, a svega 40.5% dijagnozu definitivne ALS, što je bias od skoro 60% u definitivnosti dijagnoze. Takav bias nije uočen u grupi sporadično obolelih gde je EMNG nalaz u jednom regionu bio pozitivan kod 4 pacijenta, u 2 regiona kod 7 pacijenta, a pozitivna nalaz u 3 ili 4 regiona koji sugeriše definitivnost dijagnoze kod 21 pacijenta (65.6% obolelih) (nema statistički značajne razlike između grupa ( $p = 0,074$ ). Ipak, evidentno je da je  $p$  vrednost blizu konvencionalnog nivoa značajnosti i vrlo je moguće da je uzorak veći, da bi ova razlika bila statistički značajna između dve grupe ispitanika.

Lumbalna punkcija je urađena kod 56 od 69 pacijenata, i nije uočena statistički značajna razlika u vrednosti proteina u dve ispitane grupe ( $p>0.05$ ).

Testiranje plućne funkcije sadržalo je ispitivanje standardnih spirometrijskih parametara FVC i FEV1, kao i merenje snage respiratornih mišića kroz indekse Pimax i Pemax. FVC je registrovan kod 68 pacijenata, FEV1 kod 58 pacijenta, i pokazali su značajnu statistiku razliku u korist boljih vrednosti kod sporadičnih ALS pacijenta (FEV1  $105.5\pm 18.22$  vs.  $89\pm 33.25$  i FVC  $108.5\pm 17.33$  i  $93\pm 27.41$ ,  $p<0.01$ ). Ovi rezultati ne sugerišu respiratornu insuficijenciju prema dobijenim srednjim vrednostima, ali s obzirom na dužinu trajanja bolesti FALS pacijenta, može se reći da oni sporije razvijaju respiratornu insuficijenciju u odnosu na sporadičnu grupu obolelih. Takođe, registrovana je statistički značajna razlika između dve grupe obolelih po Pimax indeksu (sporadični  $51\pm 20.06$  vs genetski  $37.4\pm 24.87$ ,  $p<0.01$ ), dok nije uočena značajna razlika obolelih po Pemax indeksu (sporadični  $74.3\pm 32.16$  vs genetski  $65.5\pm 32.64$ ,  $p>0.05$ ). U ukupnom broju pacijenta koji su iziskivali korišćenje NIV aparata nije bilo statistički značajne razlike ( $p>0.05$ ); dobijeni rezultati i duže trajanja bolesti kod FALS pacijenata indirektno ukazuje na sporiji razvoj respiratorne insuficijencije koja bi zahteva primenu NIV-a u ovoj grupi obolelih.

Nije bilo statistički značajne razlike u plasiranju perkutane gastrostome kod dve grupe ispitanika, mada je kod FALS grupe PEG bio plasiran kod svega 5.4% ispitanih, a u grupi sporadičnih ALS pacijenta kod 16.7%, sa kraćim trajanjem bolesti.

Kompatibilnost istraživanja i poređenja ove dve grupe ispitanika sadržana je u nepostojanju statističke značajne razlike u ALSFRS-r skor na početku bolesti (genetski  $42\pm 6.22$  vs sporadični  $43\pm 3.78$ ,  $p>0.05$ ).

SOD1 mutacije bile su najčešće mutacije, što predstavlja 27 (73,0%) svih ALS genetski pozitivnih pacijenata. SOD1 negativna grupa se sastojala od 10 (27,0%) pacijenata (Slika 1). Glavne demografske i kliničke karakteristike SOD1 pozitivnih i SOD1 negativnih ALS pacijenata su rezimirane u Tabeli 1. Kod 14 (51,9%) nosioca mutacija na genu za SOD1, bila je pozitivna porodična anamneza, a kod SOD1 negativnih kod dva (12,5%) pacijenta i ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p = 0.08$ ). SOD1 pozitivni i SOD1 negativni pacijenti nisu se značajno razlikovali po polu, starosti na početku bolesti, dijagnostičkom kašnjenju, prosečnom trajanju bolesti,



ALSFRS-r skor, i plućnoj funkciji ( $p > 0,05$ ). Svi SOD1 pozitivni pacijenti imali su spinalni početak bolesti i kod 85,2% obolelih prvi simptomi su bili na donjim ekstremitetima. Sa druge strane, bulbarni početak je bio češći kod SOD1 negativnih pacijenata ( $p < 0,01$ ). Jedan pacijent iz SOD1 negativne grupe imao je početak sa FTD simptomima. Senzorni poremećaji su evidentirani kod 14 (51,9%) SOD1 pozitivnih i kod dva (20 %) iz grupe SOD1 negativnih pacijenata ( $p > 0,05$ ). Poremećaji sfinkterijalne kontrole (mokrenja i/ili stolice) registrovani su samo u SOD1 pozitivnoj grupi ( $p < 0,01$ ).

#### **4.1.2. Fenotipska analiza podgrupa pacijenata sa određenim mutacijama**

U genetskoj grupi analizirano je 37 pacijenata sa definisanom mutacijom, od kojih je 27 (72,9%), pacijenta imalo mutaciju u SOD1 genu, 6 (16,2 %) ekspanziju heksonukleotidnih ponovaka u genu za c9orf72, 2 (5,4%) mutaciju u ANG genu, 1 (2,7%), pacijent je imao mutaciju u TDP43 genu i 1 (2,7%) tri mutacije gena za c9orf72, FUS i ANG .

##### **4.1.2.1. Analiza pacijenata sa mutacijom u SOD1 genu**

Genskom analizom obuhvaćeno je svih 5 egzona SOD1 gena i nesinonimne mutacije su verifikovane u egzonima 4 i 5. Ukupno je bilo 27 pacijenata sa mutacijom u SOD1 genu, od čega 21 sa mutacijom u 5. egzonu zamene leucina fenilalaninom na poziciji 144 (L144F), 4 sa zamenom aspartata alaninom na poziciji 90 (D90A, od čega 2 pacijenta sa heterozigotnom, i 2 pacijenta sa homozigotnom varijantom) i 2 pacijenta sa zamenom alanina glicinom na poziciji 145 (A145G). Inicijalno je analiza izvršena poređenjem SOD1 pozitivnih i SOD1 negativnih pacijenata (Tabela 12). Srednje godine početka bolesti u SOD1 grupi iznosile su  $51,0 \pm 11,0$  godina, a u grupi ne-SOD1 pacijenta  $55,5 \pm 12,6$  ( $p > 0,05$ .) Ukupno trajanje bolesti u SOD1 grupi u mesecima je bilo  $63,0 \pm 58,1$ , a u grupi ne-SOD1 pacijenata  $46,5 \pm 31,2$  ( $p > 0,05$ ).

Tabela 12. Kliničke karakteristike SOD1 pozitivnih i SOD1 negativnih ALS pacijenata

Karakteristika	SOD1 pozitivni	SOD1 negativni	p
N	27 (73.0%)	10 (27.0%)	
Pol (n, % muškaraca)	14 (51.9%)	7 (70.0%)	p=0.46
Starost na početku bolesti ( $\bar{x}\pm SD$ )	50.9 $\pm$ 10.9	54.9 $\pm$ 12.1	p=0.30
Trajanje bolesti (meseći, medijana)	63	46.5	p=0.10
Dijagnostičko kašnjenje (meseći, medijana)	22	10	p=0.21
Istorija ALS u porodici (n,%)	14 (51.9%)	2 (20.0%)	p=0.08
Tip ALS na početku bolesti (n, % spinalni)	27 (100%)	6 (60.0%)	p<0.01
Demencija kao inicijalni symptom (n, %)	0 (0%)	1 (10%)	p=0.27
Lokalizacija na početku bolesti (n,%)			
Gornji ekstremiteti	4 (14.8%)	4 (40.0%)	p<0.01
Donji ekstremiteti	23 (85.2%)	2 (20.0%)	
Bulbarni	0 (0%)	4 (40.0%)	
Klinička slika na početku bolesti (n, %)			
GMN+DMN	24 (88.9%)	6 (60.0%)	p=0.07
Predominantno GMN	1 (3.7%)	3 (30.0%)	
Predominantno DMN	2 (7.4%)	1 (10.0%)	
Objektivni senzorni ispadi (n, %)	14 (51.9%)	2(20.0%)	p=0.14
Poremećaji sfinktera (n, %)	15 (55.6%)	0 (0%)	p<0.01
Bulbarni znaci (n, %)	1 (3.7%)	6 (60.0%)	p<0.01
ALSFERS-r skor u momentu dijagnoze ( $\bar{x}\pm SD$ )	41.0 $\pm$ 6.0	39.1 $\pm$ 6.9	p=0.37
EMG potvrđena ALS			
Negativna	0 (0%)	1 (10.0%)	p=0.83
Moguća (1 region)	2 (7.4%)	1 (10.0%)	
Verovatna (2 regiona)	15 (55.6%)	3 (30.0%)	
Definitivna (3 ili 4 regiona)	10 (37.0%)	5 (50.0%)	
FVC (% od normalne vrednosti) ( $\bar{x}\pm SD$ )	84.7 $\pm$ 29.6	92.2 $\pm$ 21.1	p=0.45
FEV1 (% od normalne vrednosti) ( $\bar{x}\pm SD$ )	78.7 $\pm$ 34.4	102.7 $\pm$ 22.0	p=0.11
PImax MIP (% od normalne vrednosti) ( $\bar{x}\pm SD$ )	45.3 $\pm$ 24.3	42.2 $\pm$ 27.8	p=0.58
PEmax (% od normalne vrednosti) ( $\bar{x}\pm SD$ )	72.0 $\pm$ 33.1	62.3 $\pm$ 32.7	p=0.55

$\bar{x} \pm SD$  –srednja vrednost  $\pm SD$ ; GMN= gornji motoneuron; DMN=donji motoneuron; EMG=elektromiografija; FVC= forsirani vitalni kapacitet; FEV1 = forsirani ekspiracioni volumen u prvoj sekundi; MIP= maksimalni inspiratorni pritisak; MEP= maksimalni ekspiratorni pritisak;

Svi pacijenti sa SOD1 mutacijom imali su spinalni početak bolesti, sa inicijalnim zahvatnjem donjih ekstremiteta kod 85,2% obolelih iz ove grupe. Dominantna klinička prezentacija u SOD1 grupi je bila kombinovno oštećenje GMN i DMN (kod 85 % obolelih), a bulbarna simptomatologija na početku bolesti bila je prisutna samo kod jednog pacijenta (3.7%). Objektivne senzitivne ispade ispoljilo je 51.9% ispitanika iz SOD1 grupe, i svega 20% iz ne-SOD1 grupe obolelih, dok je sfinkterijalne smetnje kao atipičnu kliničku prezentaciju u okviru ALS imalo 55.6% SOD1 pozitivnih pacijenta i nijedan pacijent iz ne-SOD1 grupe ( $p < 0.01$ ).

Pacijenti sa SOD1 mutacijom su koristili aparat za neinvazivnu ventilaciju u svega 33.3% slučajeva, dok pacijenti sa ne-SOD1 mutacijom uprkos kraćem trajanju bolesti su imali stepen respiratorne insuficijencije koji zahteva upotrebu NIV-a u 40% slučajeva. Od svih SOD1 pacijenta samo je jednom implantirana PEG (3.7% slučajeva) zbog otežanog gutanja.

U grupi pacijenata sa SOD1 mutacijom, uočen je raniji početak bolesti kod pacijenata sa A145G u odnosu na pacijente sa L144F i D90A, ali ovo nije bilo statistički značajno. Senzitivni ispadi i poremećaji sfinkterijalne kontrole su bili dominantni kod pacijenata sa L144F i D90A mutacijama. Između različitih grupa SOD1 pozitivnih pacijenata nije registrovana statistički značajna razlika u dijagnostičkom kašnjenju, trajanju bolesti, mestu početka, kliničkoj prezentaciji, ALSFRS-r skoru i plućnoj funkciji u trenutku postavljanja dijagnoze (Tabela 13).

#### *4.1.2.1.1. Kliničke karakteristike pacijenata sa mutacijom L144F u SOD1 genu*

Ova mutacija SOD1 gena bila je najčešća u našoj kohorti ispitanika, i čini 77,7 % svih pozitivnih SOD1 pacijenata. U ovoj grupi ispitanika bila je jednaka polna distribucija, familijarno ispoljavanje bolesti je imalo 57.1% ispitanika (od toga samo dva pacijenta su bila iz iste porodice). Svi pacijenti su imali spinalni početak bolesti, sa predominantnim početkom na donjim ekstremitetima, i sa kombinovanom lezijom GMN i DMN na početku bolesti. Samo jedan pacijent je imao blagu bulbarnu

simptomatologiju na početku bolesti. Objektivni senzitivni ispad je imalo 52.4% obolelih, a sfinkterijalne smetnje 66.7% obolelih. U poređenju sa ne-L144F SOD1 pozitivnim pacijentima nije bilo statistički značajne razlike ni u jednom od ispitanih parametara, osim gotovo granične statističke značajnosti ( $p=0.06$ ) u domenu sfinkterijalnih disfunkcije kod L144F pozitivnih pacijenata, te se ovaj klinički znak smatra najvrednijim „plus“ znakom kod ove forme bolesti. U ovoj grupi obolelih registrovana je statistički značajna razlika u koncentraciji hloridnog anjona u odnosu na ostale SOD1 pacijente ( $p<0.05$ , niža koncentracija), kao i granična statistička značajnost povišenih vrednosti CPK ( $p=0.05$ ). U ostalim laboratorijskim parametrima nije bilo statistički značajne razlike.

Tabela 13. Kliničke karakteristike pacijenata sa najčešćim mutacijama u našoj kohorti

Karakteristika	SOD1 L144F	SOD1 D90A**	SOD1 A145G	c9orf72
N, %	21 (56.8%)	4 (10.8%)	2 (5.4%)	6 (16.2%)
Starost na početku bolesti (godine, $\bar{x}\pm SD$ )	51.4 $\pm$ 10.9	53.3 $\pm$ 8.5	35.5 $\pm$ 7.8	51.3 $\pm$ 12.4
Trajanje bolesti (meseci, medijana)	63	120	108	46.5
Dijagnostičko kašnjenje (meseci, medijana)	22	29	21	10
Istorija ALS u porodici (n,%)	12 (57.1%)	0 (0%)	2 (100%)	1 (16.7%) †
Tip ALS na početku (n,%)				
Spinalni	21 (100%)	4 (100%)	2 (100%)	4 (66.7%)
Bulbarni	0 (0%)	0(0%)	0 (0%)	2 (33.3%)
Lokalizacija na početku (n,%)				
Gornji ekstremiteti	4 (19%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33.3%)
Donji ekstremiteti	17 (81%)	4 (100%)	2 (100%)	2 (33.3%)
Bulbarni	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33.3%)
Klinička slika (n,%)				
GMN+DMN	20 (95.2%)	3 (75.0%)	1 (50.0%)	4 (66.7%)
Predominantno GMN	0 (0%)	1 25.0%)	0 (0%)	1 (16.7%)
Predominantno DMN	1 (4.8%)	0 (0%)	1 (50.0%)	1 (16.7%)
Objektivni senzorni ispadi (n, %)	11 (52.4)	3 (75.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Poremećaji sfinktera (n, %)	14 (66.7%)	1 (25.0%)	0 (0%)	0 (0%)
Bulbarni znaci (n, %)	1 (4.8%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (66.7%)
ALSFRS-r skor ( $\bar{x}\pm SD$ )	40.4 $\pm$ 6.4	41.5 $\pm$ 4.5	46	37.8 $\pm$ 8.6

GMN= gornji motoneuron; DMN=donji motoneuron; \*\* dva pacijenta su imala heterozigotnu i dve homozigotne D90A mutacije;  $\bar{x}$ - srednja vrednost; SD – standardna devijacija; † jedan pacijent imao je pozitivnu porodičnu anamnezu za nespecifičnu demenciju

#### *4.1.2.1.2. Kliničke karakteristike pacijenata sa mutacijom D90A u SOD1 genu*

Ova mutacija je opisan kod 4 ispitanika u našoj kohorti obolelih, od čega je kod 2 ispitanika registrovana pojava heterozigotne mutacije, a kod dva homozigotne. Ni jedan pacijent u ovoj grupi nije imao pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS, svi su imali spinalni početak bolesti, na donjim ekstremitetima, u našoj kohorti svi na desnoj nozi, sa inicijalno prisutnim znacima kombinovane lezije GMN i DMN kod 3 obolelala pacijenta, i kod jedne pacijentkinje sa predominantno znacima gornjeg motornog neurona. Troje obolelih je imalo objektivne senzitivne ispade, samo jedan sfinkterijalne smetnje, i nijedan bulbarnu simptomatologiju na početku bolesti. Srednje vreme početka bolesti iznosilo je  $49.5 \pm 8.54$  godina, a prosečno trajanje bolesti  $120 \pm 90.83$  meseci.

#### *4.1.2.1.3 Kliničke karakteristike pacijenata sa mutacijom A145G u SOD1 genu*

Ova mutacija je verifikovana samo kod dva pacijenta u našoj kohorti, i kod oba pacijenta sa familijarnim ispoljavanjem bolesti. Početak bolesti je bio spinalni, na donjim ekstremitetima, kod jednog pacijenta sa kombinovanom lezijom GMN i DMN, kod drugog sa predomiantno znacima DMN. Ovi pacijenti nisu imali senzitivne ispade i sfinkterijalne smetnje. U ovoj podgrupi uočene je raniji početak bolesti u odnosu na početak bolesti kod preostalih SOD1 pozitivnih pacijenata  $35.5 \pm 7.78$  godina, i trajanje bolesti slično kao u grupi D90A koje je iznosilo  $108 \pm 118.79$  meseci.

Kod pacijenata sa različitim SOD1 mutacijama nisu uočene statistički značajne razlike u sledećim kliničkim parametrima: ALSFRS-r skor na početku bolesti, svi parametri respiratorne funkcije, proteinorahija, pozitivnost EMG nalaza u trenutku dijagnoze ( $p < 0.05$ ).

#### **4.1.2.2. Analiza pacijenta sa c9orf72 mutacijom**

Šest (16,2%) pacijenata je imalo heksanukleotidnu ekspanziju u c9orf72 genu na 9 hromozomu, čime je ona predstavljala najčešću mutaciju pronađenu u našoj seriji SOD1 negativnih pacijenata (Tabela 2). Samo je jedan od njih imao je pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS, a jedan pacijent imao je nespecifičnu demenciju u svojoj porodici. Prosečni broj godina početka bolesti iznosio je  $51,3 \pm 12,4$  godina. Spinalni početak bio je prisutan u četiri (66,7%) i bulbarni kod dva (33,3%) pacijenta.

Ovi pacijenti su bili češće muškog pola, i imali su spinalni početak bolesti (kod 4 od 6 obolelih). Jedan pacijent je imao pozitivnu porodičnu anamnezu za BMN, a jedan na postojanje demencije, po anamnestičkim podacima Alchajmerovog tipa. Niko od registrovanih ispitanika nije imao u porodičnoj anamnezi postojanje FTD ili psihijatrijska oboljenja, niti je i jedan pacijent imao demenciju kao inicijalni znak bolesti. Bulbarni početak bolesti evidentiran je kod svega trećine pacijenata iz ove grupe. Većina pacijenta je imala bulbarnu afekciju rano u toku bolesti (kod 4 od 6 ispitana pacijenta). Prosečno vreme početka bolesti je bilo  $53 \pm 12,44$ , i nije se statistički razlikovalo od vremena početka bolesti kod SOD1 pozitivnih pacijenata. Prosečno trajanje bolesti iznosilo je  $46,5 \pm 35,94$  meseci, sa prosečnim dijagnostičkim kašnjenjem od 10 meseci od trenutka početka prvih tegoba. Ispitivanje respiratornih parametara nije se razlikovalo od SOD1 grupe obolelih, kao i ALSFRS r skor u trenutku postavljanja dijagnoze.

#### **4.1.2.3. Analiza pacijenata sa mutacijom u ANG genu**

Ranije opisana nesinonimna promena u ANG genu (M-24I) koja utiče na signalni peptid, otkrivena je kod dva (5,4%) pacijenta. Kod prvog pacijenta, početak bolesti je bio sa 48 godina sa znacima behejvioralne varijante FTD (potvrđene PET ispitivanjem i MRI spektroskopijom). Osamnaest meseci kasnije, EMG je potvrdio znake lezije donjeg motoneurona u dva regiona. Bolest je imala brz progresivan tok sa trajanjem od 14 meseci do smrti. Drugi pacijent je imao bulbarni početak bolesti sa 56 godina sa znacima parkinsonizma, čestim padovima, ataksijom, senzitivnim ispadima i depresijom, uz porodično ispoljavanje psihoze. Trajanje bolesti je bilo 58 meseci. Ovaj pacijent je takođe bio nosilac druge izmene u ANG genu (I46V) koji se može smatrati

retkim benignim polimorfizmom. Oba pacijenta su bila žensko pola, i bile su takođe testirane i na TDP 43, FUS i c9orf72 gene, ali mutacije nisu registrovane u ovim genima.

#### **4.1.2.4. Analiza pacijenta sa mutacijom u TDP43 genu**

Mutacija G384R TDP-43 gena, registrovana je kod jednog pacijenta. Bolest je počela u 64 godini sa kliničkom prezentacijom sindroma „flail arm“ sindroma, a preživljavanje od početka bolesti bilo je 56 meseci i bez ranije obolelih članova od ALS i FTD u porodici.

#### **4.1.2.5. Analiza pacijenta sa mutacijom u c9orf72, FUS i ANG genu**

Jedan pacijent imao je FUS mutaciju (H517P, ranije opisana samo u Japanu), sa c9orf72 ekspanzijom i K17I supstitucijom u ANG genu. Bolest je počela u 73 godini, a preživljavanje od početka bolesti do smrti iznosilo je 33 meseca. Dijagnostičko kašnjenje iznosilo je 2 godine. Pacijent je imao spinalni početak u gornjim ekstremitetima, "dropped head", rane znake respiratorne insuficijencije, promene u ponašanju kao rani znak verovatne FTD i pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS i FTD.

## **4.2. REZULTATI NEUROPSIHOLOŠKOG TESTIRANJA KOD PACIJENATA SA GENETSKOM ALS I PACIJENATA SA SPORADIČNOM ALS**

Neuropsihološko testiranje je sprovedeno kod 22 SOD1 pozitivnih, 5 SOD1 negativnih pacijenata sa genetskom ALS i 82 zdravih kontrola. Među tri ispitivane grupe nismo našli statističke razlike u starosti, nivou obrazovanja i polu (Tabela 14).

MMSE skorovi su bili niži u obe ALS grupe u poređenju sa zdravim ispitanicima ( $p < 0.01$ ). SOD1 pozitivni pacijenti su postigli znatno niži rezultat na egzekutivnom (Stroop) testu nego zdrave kontrole ( $p < 0.01$ ). Sa druge strane, SOD1 negativni pacijenti su pokazali lošiji rezultat u: opštem intelektualnom nivou (RSPM),

verbalnoj i vizuospatijalnoj memoriji (RAVLTi, ROCFc, ROCFr), egzekutivnoj funkciji (PF) ( $p < 0.01$ ), pažnji (WAIS-R-digit forward), kao i jezičkim funkcijama (CF) ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa zdravim kontrolama.

Tabela 14. Rezultati neuropsiholoških testova kod SOD1 pozitivnih i SOD1 negativnih pacijenata sa ALS

Rezultat	SOD1 pozitivni	SOD1 negativni	Zdrave kontrole
N	22	5	82
Starost	56.5±11.6	62.8±9.9	54.9±12.5
Obrazovanje	12.4±3.3	12.6±1.9	13.7±1.9
Pol (% žena)	63.6	60.0	62.2
MMSE <sup>a*,b*,c</sup>	26.9±2.8	21±4.5	28.7±1.3
RSPM <sup>a*,c</sup>	73.8±24.4	25±12.3	75.8±14.4
WAIS – R (digit forward) <sup>c,a</sup>	6.4±1.3	4.3±0.6	6.4±1.1
Stroop 3 (color word test) <sup>b*,c</sup>	120.1±37.4	150.8±42.4	94.1±18.5
PF <sup>a*,c</sup>	30.8±8.7	16±9.6	34.4±9.9
CF <sup>c,a</sup>	16.6±3.2	9.5±4.8	18.6±4.2
ROCFc <sup>a*,c,b</sup>	27.53±3.2	14.33±6.1	29.58±3.1
ROCFr <sup>a*,c</sup>	16.9±5.1	8.2±3.6	17.8±5.7
RAVLT Immediate <sup>a*,c</sup>	44 ±8.7	29 ±6.2	46.5±8.6
RAVLT Delay	8.8±3.3	7.3±3.1	9.4±2.8
RAVLT Recognition	11.6±3.5	9.3±5.0	13±1.6
BNT Total	52.4±6.1	45.8±8.9	54.9±2.5

a i a\* –  $p < 0.05$  i  $p < 0.01$  poređenjem SOD1 pozitivnih i SOD1 negativnih ALS pacijenata; b i b\* –  $p < 0.05$  i  $p < 0.01$  poređenjem SOD1 pozitivnih ALS pacijenata i zdravih ispitanika; c –  $p < 0.01$  poređenjem SOD1 negativne pacijenata i zdravih ispitanika

Primetili smo značajne razlike između dve ALS grupe (SOD1 pozitivne i SOD1 negativne) na sledećim testovima: MMSE, RSPM, PF, ROCFc, ROCFr, RAVLTi ( $p < 0.01$ ), WAIS-R i CF ( $p < 0.05$ ).

#### **4.3. UTICAJ SOCIODEMOGRAFSKIH I KLINIČKIH KARAKTERISTIKA PACIJENATA NA PREŽIVLJAVANJE**

Ovo istraživanje je sprovedeno kod 37 genetski pozitivnih i 32 sporadičnih ALS pacijenta, koji su i inicijalno upoređivani po kliničkim karakteristikama (Tabela 15). U



ispitivanju je pokazano da starost u trenutku početka bolesti utiče na preživljavanje tako što je pacijent koji je imao raniji početak bolesti imao i duže trajanje bolesti (HR=1,059, p=0,026, za svaku godinu šansa da ne preživi je za 5,9% veća). Dijagnostičko kašnjenje nije imala uticaja na preživljavanje obolelih, kao ni pozitivna porodična anamneza.

Tabela 15. Uticaj sociodemografskih i kliničkih parametara na preživljavanje ALS pacijenata (univarijantna Cox regresiona analiza)

Karakteristika ALS pacijenata	p vrednost	HR	95% interval poverenja	
Genetski pozitivni	0,857	0,911	0,329	2,524
Ženski pol	0,144	1,931	0,798	4,670
Starost na početku bolesti	0,026*	1,059	1,007	1,113
Dijagnostičko kašnjenje	0,784	0,997	0,977	1,017
Početak bolesti – bulbarni	0,039*	3,302	1,060	10,287
Cl <sup>-</sup>	0,739	0,977	0,849	1,123
CK	0,354	0,999	0,996	1,002
Lokalizacija GE	Ref.	1		
DE	0,205	0,484	0,157	1,487
Bulbarni	0,306	2,001	0,531	7,542
Lokalizacija donji eks.	0,046*	0,337	0,144	0,984
Lateralizacija levo	0,610	0,744	0,238	2,322
Oblik GMN+DMN	Ref.	1		
GMN	0,145	2,301	0,750	7,057
DMN	0,536	1,603	0,359	7,152
Oblik GMN+DMN	0,157	0,497	0,189	1,309
Senzitivni ispadi	0,616	0,780	0,295	2,063
Sfinkterijalne smetnje	0,129	0,424	0,140	1,284
Dizartrija/disfagija	0,106	2,248	0,841	6,007
El Escorial Verovatna	Ref.	1		
Moguća	0,844	0,757	0,047	12,154
Sigurna	0,778	1,340	0,176	10,222
El Escorial sigurna	0,599	1,555	0,354	6,837
Proteinorahija	0,065	44,762	0,795	2518
Pimax	0,509	0,992	0,968	1,016
Pemax	0,024*	0,979	0,962	0,997
FEV1	0,900	0,999	0,983	1,015
FVC	0,279	0,991	0,975	1,007
NIV	0,100	2,167	0,862	5,449
ALS FRS	0,076	0,942	0,882	1,006
PEG	0,102	2,577	0,828	8,015
Doppler patološki	0,728	1,192	0,443	3,206
Rilutek	0,025*	0,353	0,142	0,876
SOD1 da (n=27)	0,001**	0,117	0,034	0,399

Ref = referentna grupa, \*p<0.05, \*\*p<0.01

Spinalni početak bolesti bio je povezan sa dužim preživljavanjem obolelih ( $X^2=4,850; p=0,028$ ), kao i početak simptoma bolesti na donjim ekstremitetima ( $X^2=6,275; p=0,046$ ) u odnosu na bulbarni početak bolesti ( $X^2= 6,582; p=0.01$ ). Pacijenti koji su na EMNG nalazu imali zahvaćenost dva regiona imali su duže preživljavanje u odnosu na ispitanike koji su imali tri ili četiri zahvaćena regiona (moguće zato što je najveći broj ovih pacijenta imao i mutaciju u osnovi bolesti  $X^2=9,740; p=0,045$ ). ALSFRS skor u momentu dijagnoze pokazao je graničnu statističku značajnost uticaja na preživljavanje HR=0,942 (0,882-1,006), p=0,076. Od svih respiratornih ispitanih parametra jedino je Pemax pokazao pozitivnu korelaciju sa preživljavanjem obolelih (HR=0,979, p=0,024).

Primena riluzola je imala pozitivan uticaj na preživljavanje obolelih, u smislu da pacijenti koji su uzimali lek, su imali i duže preživljavanje ( $X^2=5,578; p=0,018$ ). Ostali ispitivani parametri kao što su pol, demencija, početni simptom bolesti, inicijalno zahvaćena strana (lateralizacija), stepen afekcije GMN i/ili DMN na početku bolesti, atipični znaci kao što su senzitivne i sfinkterijane smetnje, prisustvo dizartrije/disfagije i El Escorial kriterijumi, proteiorahija, aplikacija PEG nisu imali značaja na preživljavanje u kohorti ispitanih pacijenata.

Tabela 16. Preživljavanje pacijenata sa genetskim i sporadičnim ALS

	Aritmetička sredina (meseci)				Medijana (meseci)			
	A.S.	SE	95% interval poverenja		Medijana	SE	95% interval poverenja	
genetski	135,656	16,923	102,487	168,825	138,000	38,109	63,307	212,693
sporadični	84,896	10,239	64,828	104,964	72,000	.	.	.
Svi	133,152	15,074	103,607	162,697	138,000	36,751	65,968	210,032

A.S=aritmetička sredina; \*p=0,856

Ne postoji dokazano duže preživljavanje u grupi pacijenta koji su imali verifikovanu mutaciju u odnosu na sporadične slučajeve bolesti ( $X^2=0,033$ ;  $p=0,856$ ) (Tabela 16). Prisutvo SOD1 mutacija u odnosu na ne-SOD1 mutacije ukazivalo je na statistički bolje preživljavanje u SOD1 grupi ( $X^2=16,546$ ;  $p<0,001$ ) (Tabela 17), dok subsegmentna analiza u samoj grupi SOD1 pozitivnih mutacija nije pokazala da i jedna pojedinačna mutacija utiče statistički značajno na duže preživljavanje ( $X^2=0,918$ ;  $p=0,632$ ). Takođe, nije uočena statistički značaja razlika u preživljavanju kod *de novo* SOD1 pozitivnih pacijenta i pacijenta sa pozitivnom porodičnom anamnezom ALS i SOD1 mutacijom ( $X^2=0,528$ ;  $p=0,467$ ) (Tabela 18).

Tabela 17. Uticaj prisutva SOD1 mutacije na preživljavanje kod genetskog ALS

SOD1	Aritmetička sredina (meseci)				Medijana (meseci)			
	A.S.	SE	95% interval poverenja		Medijana	SE	95% interval poverenja	
ne	59.240	12.941	33.876	84.604	48.000	12.296	23.899	72.101
da	169.044	18.955	131.893	206.196	.	.	.	.
Ukupno	135.656	16.923	102.487	168.825	138.000	38.109	63.307	212.693

A.S=aritmetička sredina; \*  $p<0,001$

Tabela 18. *De novo* SOD1 pozitivni pacijenti (bez pozitivne porodične anamneze za ALS-genetski ALS) i pacijenti sa SOD1 mutacijom i pozitivnom porodičnom anamnezom ALS (FALS) – poređenje preživljavanja

SOD1 mutacija	Aritmetička sredina (meseci)				Medijana (meseci)			
	A.S.	SE	95% interval poverenja		Medijana	SE	95% interval poverenja	
Genetski	180,277	23,430	134,354	226,199	.	.	.	.

FALS	138,000	20,610	97,604	178,396	142,000	39,716	64,157	219,843
Svi	169,044	18,955	131,893	206,196	.	.	.	.

A.S=aritmetička sredina; \* p=0,765

Faktori koji su se pokazali kao značajni u univarijantnoj analizi uključeni su kao nezavisni faktori u multivarijantnu Cox regresionu analizu sa smrtnim ishodom kao zavisnom varijablom. Može se zaključiti da ALS pacijenti ženskog pola, sa bulbarnim početkom bolesti i nižim ALSFRS-r skorom u trenutku dijagnoze su značajni prediktori ranijeg smrtnog ishoda. Rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. Uticaj sociodemografskih/kliničkih parametara na preživljavanje kod ALS – multipla Cox regresiona analiza (*forward* metod)

		P vrednost	HR	95% interval poverenja	
Korak 1	Bubarni početak	0,039	3,302	1,060	10,287
Korak 2	Bubarni početak	0,017	4,223	1,293	13,795
	ALS_FRS	0,036	0,929	0,867	0,995
Korak 3	Ženski pol	0,043	2,875	1,036	7,979
	Bubarni početak	0,004	7,182	1,867	27,619
	ALS_FRS	0,039	0,931	0,869	0,996
Korak 4	Ženski pol	0,017	4,135	1,292	13,237
	Bubarni početak	0,016	5,470	1,377	21,728
	Oblik GMN+DMN	0,073	0,324	0,095	1,109
	ALS_FRS	0,041	0,932	0,871	0,997

#### 4.4. STRUKTURNE PROMENE MOZGA I KIČMENE MOŽDINE KOD PACIJENATA SA GENETSKOM ALS – ANALIZA MR

U ovom delu istraživanja eksperimentalnu grupu je činilo 20 pacijenata sa SOD1 mutacijom, od čega je mutaciju L144F imalo 16 pacijenta, 2 pacijenta su imala mutaciju A145G i 2 pacijenta D90A mutaciju. Drugu eksperimentalnu grupu je činilo 11 pacijenata sa sporadičnom ALS (SALS), koji su bili upareni sa SOD1 grupom po starosti, polu, MRC skor i funkcionalnom oštećenju merenom pomoću ALSFRS-R

skale. Kontrolnu grupu su činila 33 zdrava ispitanika izabrana iz baze podataka od 150 ispitanika tako da budu upareni po starosti i polu sa obe eksperimentalne grupe (Tabela 20). Izvršena je statistička analiza kliničkih i neuropsiholoških karakteristika u ovoj podgrupi ispitanika.

SALS pacijenti su imali kraće trajanje bolesti ( $p=0,01$ ) i brži funkcionalni pad (trend prema značaju,  $p=0,07$ ) u odnosu na ALS pacijente sa SOD1 mutacijom. Osim jednog SALS ispitanika koji je imao bulbarne simptome, svi pacijenti u obe grupe imali su spinalni početak bolesti.

Tabela 20. Demografske i kliničke karakteristike ALS SOD1 pacijenata, SALS pacijenata i zdravih kontrola uključenih u MR analizu

Karakteristike	<i>SOD1</i> ALS	sALS	HC	<i>p</i> <i>SOD1</i> ALS vs HC	<i>p</i> sALS vs HC	<i>p</i> <i>SOD1</i> ALS vs sALS
N	20	11	33			
Starost (godine)	56.0 ± 12.0	52.6 ± 12.4	56.0 ± 12.3	0.83	0.49	0.42
Pol (Ž/M)	12/8	4/7	15/18	0.30	0.59	0.21
Trajanje bolesti (meseći)	69.9 ± 50.5	27.9 ± 29.0	-	-	-	<b>0.01</b>
ALSFRS-r (0-48)	36.4 ± 6.4	38.2 ± 8.1	-	-	-	0.50
Stopa pada ALSFRS-r (mesečno)	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4	-	-	-	<u>0.07</u>
Ukupan MRC skor levih GE (0-35)	23.9 ± 7.0	26.9 ± 8.0	-	-	-	0.27
Ukupan MRC skor desnih GE (0-35)	23.9 ± 7.2	28.4 ± 7.5	-	-	-	0.10
Ukupan MRC skor levih DE (0-25)	13.4 ± 7.7	16.2 ± 5.7	-	-	-	0.31
Ukupan MRC skor desnih DE (0-25)	12.9 ± 7.0	16.2 ± 5.9	-	-	-	0.25
FVC (%)	74.9 ± 35.5	86.2 ± 43.6	-	-	-	0.44

U tabeli brojevi su srednja vrednost ± standardna devijacija ili frekvencije. *p* vrednosti se odnose na ANOVA modele, nakon čega sledi post-hoc pojedinačna analiza.

MRC= *Medical Research Council* skala za procenu snage mišića

Iako su SALS pacijenti uglavnom bili manje obrazovani od SOD1 ALS pacijenata, kognitivni profili SOD1 pozitivnih i SALS pacijenata bili su slični, sa postojanjem blagog poremećaja koji uključuje egzekutivne funkcije, ali i verbalno pamćenje i jezik, u približno 10-30% slučajeva (Tabela 21). Dok su izvršni (egzekutivni) deficiti bili slični u dve grupe pacijenata, SALS pacijenti su imali veće oštećenje u zadacima koji procenjuju odloženi verbalni odgovor i imenovanje.

Tabela 21. Neuropsihološke karakteristike SOD1 ALS pacijenata, SALS pacijenata i zdravih kontrola.

	SOD1 ALS	sALS	HC	<i>p</i> SOD1 ALS vs HC	<i>p</i> sALS vs HC	<i>p</i> SOD1 ALS vs sALS
Obrazovanje (godine)	12.8 ± 2.8	10.6 ± 3.6	13.2 ± 2.7	0.47	0.03	0.07
MMSE	27.1 ± 2.9 (20%)	27.1 ± 2.8 (18%)	29.8 ± 0.5	<0.001	<0.001	0.98
<i>Mišljenje i egzekutivne funkcije</i>						
Raven-ove progresivne matrice	37.6 ± 10.7 (0%)	37.1 ± 12.7 (0%)	NA	-	-	0.82
Fonemska fluentnost	10.4 ± 2.9 (15%)	10.0 ± 3.3 (33%)	13.3 ± 2.7	0.001	0.01	0.78
Semantička fluentnost	16.9 ± 3.2 (0%)	17.2 ± 3.5 (0%)	20.1 ± 4.6	0.04	0.13	0.55
Digitalni raspon unazad	4.7 ± 1.3 (15%)	4.3 ± 1.5 (30%)	6.8 ± 2.2	<0.001	0.002	0.48
<i>Verbalna memorija</i>						
Digitalni raspon unapred	6.4 ± 1.3 (10%)	6.2 ± 1.0 (10%)	8.4 ± 2.2	0.002	0.007	0.60
Rey-ov test verbalnog pamćenja – neposredne prisećanje	45.0 ± 8.5 (5%)	39.7 ± 6.8 (33%)	46.3 ± 10.5	0.45	0.05	0.12
Rey-ov test verbalnog pamćenja – odloženo prisećanje	9.2 ± 3.0 (10%)	7.1 ± 1.5 (0%)	9.6 ± 2.8	0.52	0.02	0.04
Rey-ov test verbalnog pamćenja – prepoznavanje	11.8 ± 3.6 (30%)	10.9 ± 1.4 (63%)	14.1 ± 1.4	0.004	<0.001	0.09
<i>Imenovanje</i>						
Bostonski test imenovanja	53.8 ± 4.3 (10%)	46.8 ± 6.2 (36%)	58.1 ± 1.6	<0.001	<0.001	0.002

#### **4.4.2. Debljina korteksa**

Nisu utvrđene značajne razlike između pacijenata sa SOD1 ALS, sALS pacijenata i zdravih kontrola u debljini korteksa 68 regiona izvedenih iz atlasa Desikan. Posebno treba izdvojiti da su sve tri grupe imale sličnu debljinu primarnog motornog korteksa (podaci nisu prikazani).

#### **4.4.3. Putevi bele moždane mase**

U poređenju sa zdravim kontrolama, SALS pacijenti imali su značajno smanjenje funkcionalne anizotropije (FA) i levog i desnog kortikospinalnog puta (Tabela 22,  $p=0,001$  i  $p=0,02$ , redom) i povećan rad levog kortikospinalnog puta ( $p=0,01$ ). Pacijenti sa SOD1 imali su promene na DTI koje su bile između zdravih kontrola i SALS pacijenata, dostižući trend prema značaju u poređenju sa svakom od ovih grupa ( $p=0,06$ ) za FA u oba poređenja, tj. SOD1 ALS vs. kontrole i SOD1 ALS vs. SALS. Nisu utvrđene značajne razlike među grupama u pogledu DTI merenja korpus kalozuma čak i kada su pojedinačno razmatrani delovi kaloznih vlakana (tj. telo, genu i splenijum odvojeno).

#### **4.4.4. Funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja**

Posmatrajući sensorimotornu mrežu, sALS pacijenti su pokazali povećanu funkcionalnu povezanost desnog precentralnog korteksa u poređenju sa kontrolama, što pokazuju i *voxel-wise* analiza i analiza regiona od interesa (ROI) (Grafikon 2). Uz to, ROI analiza je pokazala povećanu funkcionalnu povezanost i levog precentralnog korteksa pacijenata sa SALS u odnosu na kontrole ( $p=0,05$ ).

Pacijenti sa SOD1 ALS imali su "veće" vrednosti za funkcionalnu povezanost u odnosu na kontrolnu grupu zdravih, a manje u odnosu na SALS, ali bez statičke značajnosti ( $p>0,05$ ). Ni u drugim kortikalnim mrežama nisu primećene razlike između grupa u stanju mirovanja.

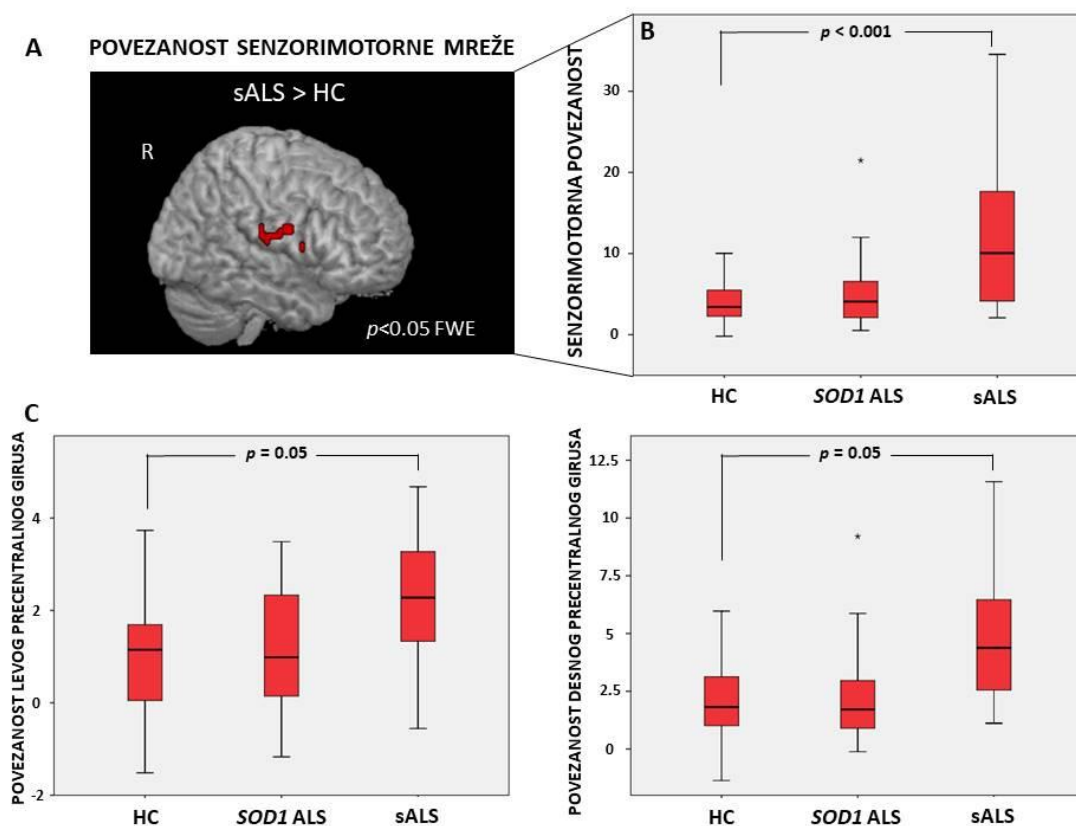
Tabela 22. DTI puteva bele mase kod pacijenata sa SOD1 ALS, pacijenata sa sporadičnim ALS i zdravih kontrola.

		FA						MD [ $\times 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ]					
		SOD1 ALS	sALS	HC	$p^*$	$p^\#$	$p^\S$	SOD1 ALS	sALS	HC	$p^*$	$p^\#$	$p^\S$
CST	L	$0.60 \pm 0.03$	$0.58 \pm 0.03$	$0.61 \pm 0.03$	0.06	0.001	0.06	$0.73 \pm 0.03$	$0.75 \pm 0.02$	$0.73 \pm 0.03$	0.99	0.25	0.25
	D	$0.58 \pm 0.02$	$0.56 \pm 0.02$	$0.59 \pm 0.03$	0.29	0.02	0.13	$0.74 \pm 0.03$	$0.75 \pm 0.03$	$0.74 \pm 0.03$	0.82	0.45	0.45
CC		$0.57 \pm 0.02$	$0.56 \pm 0.03$	$0.57 \pm 0.02$	0.82	0.05	0.27	$0.91 \pm 0.06$	$0.90 \pm 0.04$	$0.91 \pm 0.05$	0.78	0.78	0.78
CC-koleno		$0.53 \pm 0.02$	$0.52 \pm 0.03$	$0.52 \pm 0.02$	0.46	0.85	0.46	$0.89 \pm 0.07$	$0.89 \pm 0.05$	$0.92 \pm 0.07$	0.23	0.23	0.83
CC-telo		$0.54 \pm 0.02$	$0.53 \pm 0.03$	$0.54 \pm 0.02$	0.64	0.26	0.33	$0.89 \pm 0.08$	$0.88 \pm 0.04$	$0.88 \pm 0.04$	0.73	0.73	0.73
CC-splenijum		$0.60 \pm 0.02$	$0.59 \pm 0.03$	$0.60 \pm 0.02$	0.53	0.41	0.53	$0.95 \pm 0.05$	$0.95 \pm 0.06$	$0.94 \pm 0.07$	0.90	0.90	0.90
		axD [ $\times 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ]						radD [ $\times 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ]					
		SOD1 ALS	sALS	HC	$p^*$	$p^\#$	$p^\S$	SOD1 ALS	sALS	HC	$p^*$	$p^\#$	$p^\S$
CST	L	$1.30 \pm 0.04$	$1.30 \pm 0.04$	$1.32 \pm 0.04$	0.16	0.16	0.84	$0.45 \pm 0.04$	$0.47 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.03$	0.28	0.01	0.10
	D	$1.29 \pm 0.04$	$1.29 \pm 0.04$	$1.30 \pm 0.05$	0.75	0.75	0.81	$0.46 \pm 0.03$	$0.48 \pm 0.03$	$0.46 \pm 0.04$	0.47	0.08	0.19
CC		$1.55 \pm 0.09$	$1.53 \pm 0.05$	$1.57 \pm 0.07$	0.59	0.59	0.59	$0.58 \pm 0.05$	$0.59 \pm 0.05$	$0.59 \pm 0.04$	0.91	0.91	0.91
CC-koleno		$1.48 \pm 0.10$	$1.46 \pm 0.07$	$1.51 \pm 0.09$	0.49	0.38	0.49	$0.60 \pm 0.06$	$0.60 \pm 0.05$	$0.62 \pm 0.06$	0.28	0.33	0.88
CC-telo		$1.49 \pm 0.10$	$1.45 \pm 0.06$	$1.48 \pm 0.06$	0.83	0.37	0.37	$0.59 \pm 0.07$	$0.59 \pm 0.05$	$0.58 \pm 0.04$	0.92	0.92	0.92
CC-splenijum		$1.66 \pm 0.09$	$1.64 \pm 0.07$	$1.67 \pm 0.11$	0.68	0.68	0.68	$0.59 \pm 0.04$	$0.59 \pm 0.06$	$0.59 \pm 0.06$	0.98	0.98	0.98

Vrednosti su srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. p vrednosti se odnose na ANOVA model, stopa lažnog otkrivanja korigovana za multipla upoređivanja.  $p^*$ : SOD1 ALS vs zdrave kontrole;  $p^\#$ : sALS vs zdrave kontrole;  $p^\S$ : SOD1 ALS vs SALS. Skraćenice: axD= aksijalna difuzivnost; CC= corpus callosum; FA= frakciona anizotropija; HC= zdrave kontrole; L= levo; MD= srednja difuzija; R= desno; radD= radijalna difuzivost; SALS= sporadični ALS pacijenti



Grafikon 2. Funkcionalna povezanost delova korteksa kod pacijenata sa SALS i SOD1 ALS u stanju mirovanja



(A) Regije povećane senzomotorne funkcionalne povezanosti kod SALS u poređenju sa zdravim kontrolama (HC), kao što pokazuje voxel-wise analiza. Rezultati su prikazani na mapi standardnog mozga (*Montreal Neurological Institute*) prema radiološkoj konvenciji sa nivoom značajnosti  $p < 0.05$ , uz *family-wise error* korekciju za multipla poređanja. D= desno; L= levo.

(B) Box-plot grafikon koji prikazuje srednju senzomotornu funkcionalnu vrednost povezanosti kod SOD1 ALS, SALS pacijenata i zdravih kontrola.

(C) Box-plot grafikoni koji pokazuju srednju funkcionalnu vrednost povezanosti precentralnog girusa kod SOD1 ALS, SALS pacijenata i zdravih kontrola, kao što pokazuje analiza regiona od interesa.

Za (B) i (C),  $p$  vrednosti se odnose na ANOVA modele, nakon čega slede *post-hoc* pojedinačna upoređivanja.

#### 4.4.5. MR cervikalne kičme

SOD1 ALS pacijenti imali su značajno smanjenje srednje vrednosti površine poprečnog preseka cervikalne kičmene moždine od nivoa C2 do nivoa C7 u odnosu na SALS pacijente (Tabela 23, Grafikon 3). Nisu utvrđene značajne razlike između SOD1 ALS i SALS pacijenata u pogledu srednjih vrednosti magnetizacionog transfera na svim ispitivanim nivoima cervikalne kičme, tačnije od C2 do C5 (Grafikon 4).

Tabela 23. Površina poprečnog preseka cervikalne kičme i odnos magnetizacionog transfera kod SOD1 i SALS pacijenata

Nivo cervikalne kičme	PPP [mm <sup>2</sup> ]		
	SOD1 ALS	SALS	<i>p</i>
C2	64.77 ± 10.64	81.82 ± 8.88	<0.001
C3	68.10 ± 10.78	86.32 ± 10.00	<0.001
C4	70.59 ± 10.68	89.22 ± 10.07	<0.001
C5	68.37 ± 9.55	86.49 ± 8.70	<0.001
C6	61.07 ± 9.11	77.99 ± 8.23	<0.001
C7	50.34 ± 8.85	66.36 ± 8.32	<0.001
Odnos zapremina / dužina	57.52 ± 8.38	75.46 ± 8.21	<0.001
MTR			
	SOD1 ALS	sALS	<i>p</i>
C2	46.62 ± 1.37	47.34 ± 2.00	0.36
C3	46.36 ± 1.81	47.31 ± 2.30	0.36
C4	46.58 ± 2.35	46.86 ± 1.92	0.75
C5	46.50 ± 2.04	46.15 ± 2.27	0.75

Rezultatu su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ili učestalost. *P* vrednosti se odnose na ANOVA modele, nakon čega slede post-hoc pojedinačna upoređivanja. Skraćenice: PPP= površina poprečnog preseka; MTR= odnos magnetizacionog transfera;

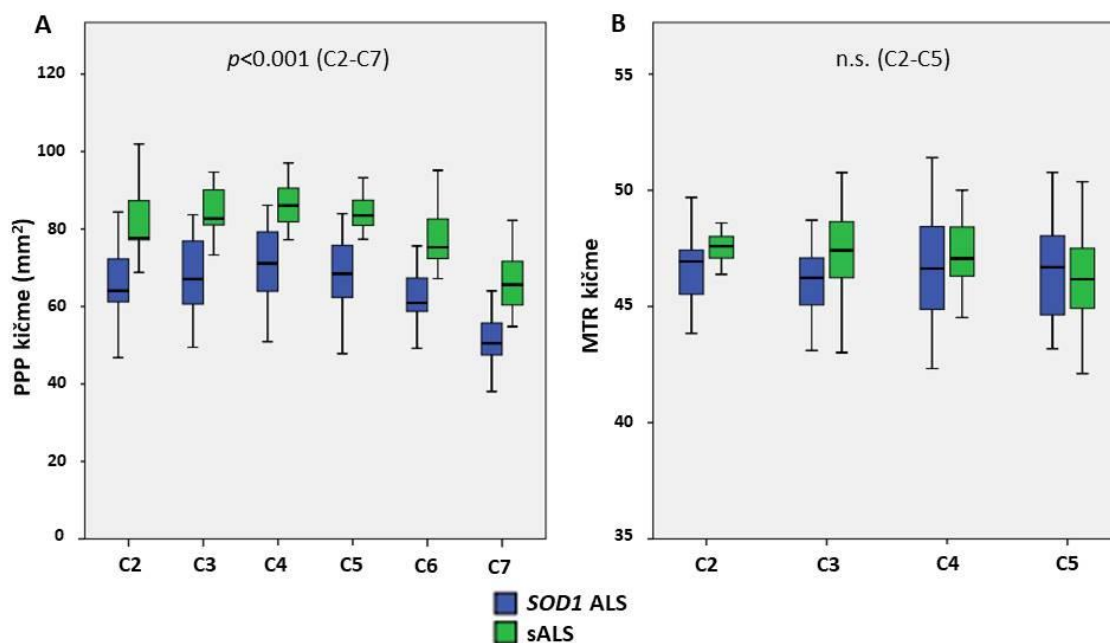
#### 4.4.6. Korelacije kliničkih podataka sa nalazima na MR mozga i kičmene moždine

Vrednosti ALSFRS-r skora bile su u korelaciji sa vrednostima FA kortikospinalnog puta u grupi pacijenata sa SALS (levo: rho=0.60, p=0.01; desno: r=0.55, p=0.02). Vrednosti ovog skora su takođe bile u korelaciji sa srednjom vrednošću

poprečnog preseka kičmene moždine i sa segmentnim površinama od nivoa C3 do nivoa C6 u grupi pacijenata sa SOD1 ALS i u SALS grupi ( $\rho=0.49-0.72$ ,  $p=0.01-0.05$ ).

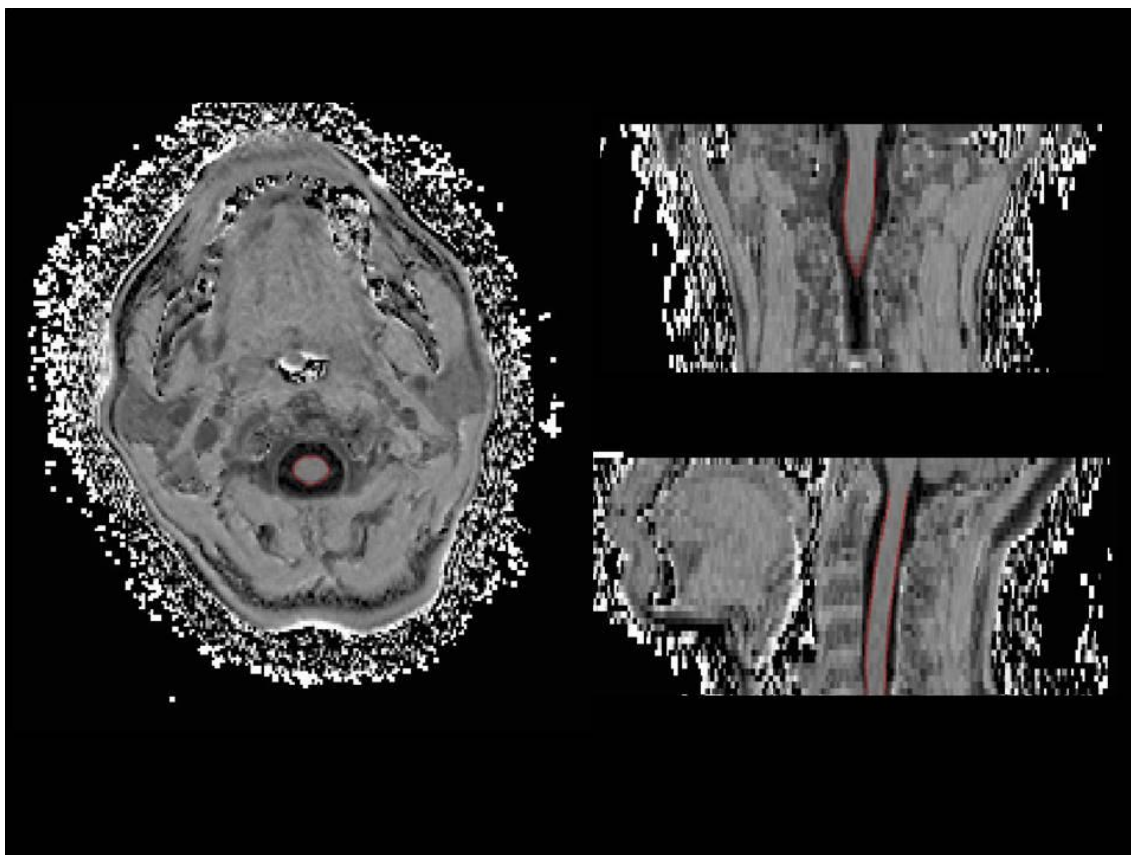
Trajanje bolesti je bilo u korelaciji sa srednjom vrednošću površine poprečnog preseka kod pacijenata sa SOD1 ALS ( $\rho=-0.60$ ,  $p=0.02$ ) i SALS pacijenata ( $\rho=-0.80$ ,  $p=0.003$ ). Trajanje bolesti je bilo u korelaciji i sa segmentnim površinama kičmene moždine od C2 do C6 u obe ALS grupe ( $\rho=(-0.48)-(-0.84)$ ,  $p=0.002-0.02$ ). Nisu pronađene druge značajne korelacije između kliničkih podataka i MRI nalaza.

Grafikon 3. Rezultati nalaz MR cervikalne kičme.



Vrednosti poprečnog preseka cervikalne kičme (A) (PPP) i (B) odnos magnetizacionog transfera (MTR) na definisanim anatomskim mestima prema mestu izlaska nervnih korenova kod pacijenata sa SOD1 ALS i SALS.  $p$  vrednosti se odnose na ANOVA modele.

Grafikon 4. Primer odnosa magnetizacionog transfera (MTR) kod pacijenta sa *SOD1* ALS



Prikazani su aksilani (levi), koronarni (gornji desni) i sagitalni (donji desni) presecci. Kontura kičmene moždine dobijena metodom aktivne površine prikazana je crvenom bojom.

## 5. DISKUSIJA

Ovo je prva studija o genetskim i kliničkim podacima ALS pacijenata iz najvećeg tercijarnog centra u Srbiji. Najčešće mutacije bile su u SOD1 genu identifikovane kod 73% naših genetski pozitivnih pacijenata, dok je 27% pacijenata imalo mutacije u sledećim genima: C9orf72, ANG, TDP-43 i FUS.

SOD1 pozitivni ALS pacijenti su imali spinalni početak bolesti na donjim ekstremitetima, sa čestim poremećajima senzibiliteta, sfinkterijalnom disfunkcijom i blagim kognitivnim padom. Egzekutivna disfunkcija opisana u našoj grupi pacijenata baca novo svetlo na oštećenje mozga kod SOD1 pozitivnih ALS pacijenta (posebno kod L144P i A145G pozitivnih pacijenata, gde ovakve promene ranije nisu opisane). Sa druge strane, SOD1 negativni pacijenti su imali varijabilniji fenotip, obično sa bulbarim poremećajima, šire rasprostranjenim kognitivnim oštećenjem (osim disegzekutivnog sindroma, vizuospacijalne disfunkcije i vizuospacijalnog poremećaja memorije) i čestim preklapanjima sa drugim neurodegenerativnim bolestima.

Sličan procenat SOD1 pozitivnih pacijenata je takođe registrovan u FALS kohortama iz Japana, Belgije i Škotske (u rasponu od 31 do 71%) (Kaur SJ et al., 2016). Sa druge strane, kod većine ALS kohorti iz zapadnih zemalja, SOD1 mutacije su bile druge najčešće posle c9orf72 mutacije (Chiò A et al, 2012). Visoka učestalost L144F mutacije SOD1 gena u našoj populaciji može biti posledica prisustva tzv. osnivačkog hromozoma, što može da bude korisna informacija za genetsko savetovanje. Međutim, penetrantnost ove mutacije još uvek nije poznata, pa se stoga još uvek ne može dati pravi savet u cilju eventulane prenatalne dijagnostike. Takođe, moguće je da drugi mehanizmi mogu objasniti visoku prevalenciju SOD1 mutacije kod naših ALS ispitanika kao što su: produžen životni vek u opštoj populaciji, česti ratovi sa migracijama, modifikacija od strane drugih gena na drugim mestima u genomu, kao i poboljšana dijagnostička tačnost.

L144F mutacija bila je najčešća SOD1 mutacija u našoj populaciji sa 57% pozitivnih ispitanika. Ova mutacija prethodno je opisana u italijansko-rumunskoj porodici (Masè G et al., 2001), kao i kod pacijenata iz Turske i Rusije (Özoğuz A et al., 2015; Lysogorskaia EV et al., 2015). Kliničke karakteristike ranije opisanih pacijenata

bile su spinalni početak na donjim ekstremitetima, sa kombinovanim znacima oštećenja GMN i DMN, što je fenotipski poudarno našoj kohorti. Atipične kliničke karakteristike kao što su poremećaji sfinktera kod 67% pacijenata i senzitivni poremećaji kod više od polovine naših pacijenata, zajedno sa dugim prosečnim preživljavanjem, čine pacijente iz ove grupe vrlo specifičnim i prepoznatljivim za našu sredinu.

D90A mutacija je identifikovana u 11% naših genetski pozitivnih ALS pacijenata, dva su bila homozigotna, a dva pacijenta su imali heterozigotnu varijantu. Dok su u mnogim evropskim zemljama D90A homozigotni pacijenti pokazali uniforman i veoma postepen progresivan fenotip sa atipičnim nemotornim karakteristikama (senzitivnim poremećajima), heterozigotni pacijenti opisani u Švedskoj, Finskoj, Belgiji, Rusiji, Velikoj Britaniji, SAD, Francuskoj, Španiji i Italiji pokazali su varijabilniji i agresivniji fenotip (Giannini F et al., 2010). Dominacija simptoma zahvaćenosti GMN primećena je kod jednog od naših heterozigotnih pacijenata, slično kao što je opisao Luigetti i sar (Luigetti M et al., 2009). U našoj D90A pozitivnoj grupi, tri (75%) pacijenata su imala objektivni senzitivni deficit. Oba naša D90A heterozigotna ispitanika su imali dobru prognozu sa dužim preživljavanjem što nije opisano u literaturi. Od dva homozigotna nosioca mutacije D90A, jedan je imao duže preživljavanje kao što je i uočajeno za ovu grupu pacijenata na osnovu podataka u literaturi, ali je drugi imao progresivan tok s sličnim trajanjem bolesti kao kod sporadičnih ALS, što nije uobičajeno.

A145G mutacija je identifikovana kod 6% SOD1 pozitivnih pacijenata. Klinički fenotip ove SOD1 mutacije još uvek nije opisan u literaturi. Naši neobjavljeni podaci o pet porodica sa ovom mutacijom su pokazali moguće genetsko poreklo na teritoriji južnog i centralnog dela Hrvatske [<http://vvv.alsod.org>]. Na osnovu kliničkog fenotipa, ovi FALS pacijenti su imali raniji početak bolesti (oko 36 godine), sa prvim simptomima na donjim ekstremitetima i primarnim znakovima oštećenja DMN. Svi nosioci ove mutacije su preživeli do kraja ove studije sa prosečnom dužinom trajanja bolesti od 108 meseci.

Između SOD1 negativnih pacijenata u odnosu na SOD1 pozitivne pacijente u odnosu na demografske i kliničke podatke, nismo uočili nikakve razlike izuzev češćih bulbarnih simptoma u SOD1 negativnoj grupi.

Sve do 2011. godine smatralo se da su najzastupljenije mutacije kod FALS mutacija u SOD1 genu, a potom je u dve velike nezavisne studije pokazano prisustvo GGGGCC (heksanukleotidne) ekspanzije u nekodirajućem regionu hromozoma 9p.21 (c9orf72) kod značajnog broja pacijenata sa udruženošću ALS i FTD. Po svim do danas objavljenim radovima, ekspanzija u c9orf72 genu predstavlja najčešći uzrok FALS (24-40%) i porodične FTD (12-25%) u svetu. U porodicama sa pojavom ALS-FTD kompleksa, učestalost raste na 50-72%. Ipak, daljim istraživanjima potvrđeno je predominantno ispoljavanje ove mutacije pre svega u zemljama Evrope i Severne Amerike, dok je učestalost u azijskim zemljama mala. Sa mutacijom u ovom genu, pored sada već klasičnih fenotipova SALS, FALS, ALS-FTD i FTD, opisani su i drugi neurološki fenotipovi kao što su PMA, PLS, Huntingtonova, Alchajmerova i Parkinsonova bolest. Kliničke karakteristike ALS pacijenata sa c9orf72 ekspanzijom su prisustvo bulbarne simptomatologije (koja je veoma retko ispoljena u npr. SOD1 FALS), kognitivna disfunkcija i kraće trajanje bolesti (agresivniji tok bolesti posebno ako je ispoljeno više od 23 ponovaka) u odnosu na izolovane npr. TDP-43 ili većinu SOD1 fenotipove. Ekspanzija u c9orf72 genu utvrđena je kod 7% SALS pacijenata.

Samo 16% naših genetskih pozitivnih pacijenata su bili nosioci ekspanzije heksanukleotida u c9orf72 genu. Rezultati ove sadašnje studije ukazali su da mutacije ovog gena nisu najčešće kod naših ALS pacijenata, nasuprot većini ALS kohorti iz zapadnih zemalja (Chiò A et al., 2012; Majounie E et al., 2012). Za pacijenti iz naše kohorte bilo je karakteristično da su imali raniji početak bolesti, relativno kratko dijagnostičko kašnjenje, češći spinalni početak sa trajanjem bolesti od 46 meseci; samo je jedan pacijent imao FTD. Ove kliničke karakteristike se razlikuju od opisa u literaturi i samo su još jedna potvrda velike fenotipske varijabilnosti vezane za mutaciju c9orf72 gena (Snowden JS et al., 2013).

Dva pacijenta imala su ANG mutaciju sa ALS plus karakteristikama uključujući i bihejvioralno ili kognitivno oštećenje na početku bolesti, što u prethodnim studijama nije registrovano kod ove vrste mutacije (Greenway MJ et al., 2006; Gellera C et al., 2008). Do sada je opisano oko 30 mutacija u ovom genu (14q 11.2), ali samo jedna (K171I) je pokazala udruženošću sa pojavom kliničke ALS (Pan et al 2016). Mutacije u ovom genu opisane su i kod FALS i kod SALS pacijenata (posebno kod pacijenata irskog ili škotskog porekla, mada su mutacije u ANG genu opisane i u Brazilu, Kini,

Francuskoj, Nemačkoj, Italiji, Holandiji, Švedskoj i SAD). U nekoliko FALS slučajeva identifikovana je udruženost mutacija gena za ANG i mutacija FUS i SOD1 gena. Međutim, mutacije gena za ANG uočene su i kod zdravih pojedinaca, kao i kod pacijenata sa izolovanom FTD ili Parkinsonovom bolešću.

TDP43 mutacija gena (G384R), koju smo evidentirali samo kod jednog pacijenta, ranije je opisana u francuskoj kohorti (Millecamps S et al., 2010) sa sličnim uzrastom na početku bolesti i kliničkom prezentacijom sindroma „flail arms“. Mutacija u ovom genu prvi put je opisana 2008. godine (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008; Yokoseki et al., 2008) i do sada su različite mutacije verifikovane kod oko 4% FALS i oko 1% SALS pacijenata (slično kao i mutacijeu FUS genu). Do danas je opisano više od 50 mutacija u TDP43 genu (1 p36), najčešće su locirane u C-terminalnom delu koji je kodiran egzonom 6 TDP-43 proteina. Ovaj protein je opisan kao glavna komponenta ubikvitarnih citoplazmatskih inkluzija prisutnim u degenerativno izmenjenim motornim neuronima kod ALS pacijenata. Vezivanje ovog proteina u agregate moglo bi da ima negativnu ulogu u njegovoj funkcionalnosti, a samim tim da dovede i do neurotokičnosti preko mehanizma izmenjenog funkcionisanja ubikvitin-proteaznog i autofagnog-lizozomskog sistema. Pored nagomilavanja u ćelijama motornih neurona, TDP43 se nagomilava u svom izmenjenom hiperfosforilisanom obliku i u ćelijama mikroglije, koje imaju svoju ulogu pre svega u imunopatogenezi ALS. TDP43 inkluzije ispoljavaju patogenost bez obzira na osnovnu funkciju samog proteina. Najveći broj opisanih mutacija u ovom genu su tzv. „missense“ ili na srpskom nesinonimne mutacije koje se nasleđuju AD. Pacijenti sa ovim mutacijama u najvećem broju slučajeva mogu imati raniji početak bolesti, sa prvim simptomima i znacima predominantno na gornjim ekstremitetima, kao i duže trajanje bolesti u poređenju sa SALS pacijentima. Međutim, opisana je i rasna razlika ispoljavanja mutacije u TDP-43 genu, tako da je kod više od 50% pozitivnih TDP43 pacijenata sa ALS bele rase, početak bolesti bio na gornjim ekstremitetima, dok je kod skoro 60% TDP43 pozitivnih pacijenta u Aziji evidentiran bulbarni početak bolesti. Takođe, sa mutacijom u TDP 43 genu u literaturi su opisivani i pacijenti sa izolovanom FTD, ALS-FTD kompleksom kao i ALS sa parkinsonizmom i FTD sa parkinsonizmom.



Zanimljivo je da je samo jedan pacijent sa FUS (H517P) mutacijom opisan u našoj kohorti. Ova mutacija je bila udružena sa c9orf72 ekspanzijom i K17I varijantom u ANG genu. Pacijent je imao spinalni početak bolesti sa *dropped head* fenomenom i promenama ponašanja kao ranim znakom verovatne FTD. Sličan slučaj samo sa FUS mutacijom opisali su Chio i sardnici (Chiò A et al., 2011), ali bez kognitivnog deficita. Van Es i sar et al. (van Es MA et al., 2009) opisali su FALS pacijenta sa ALS-FTD samo sa K17I ANG mutacijom, za koju se smatra da može povećati rizik za ALS kod ljudi bele rase (Pan L et al., 2015). Naš slučaj potvrđuje ranije zapažanje da klinički tok ALS koji se vezuje za promene u jednom genu može biti modulisan drugim uzročnim ili pridruženim genima i ukazuje na to da se mora izvršiti ekstenzivan skirining i drugih gena koje se vezuju sa ALS kod pacijenata sa atipičnim fenotipom za određenu verifikovanu gensku mutaciju.

Uopšteno govoreći, mi smo evidentirali kod 16% pacijenata da su bili nosioci mutacije u jednom od ALS testiranih gena, čija je frekvencija 94% u FALS i 9% u očigledno sporadičnim slučajevima. Slična učestalost sporadičnih ALS (8,2%) pacijenata primećena je kod slovenačke populacije (Vrabec K et al., 2015). Međutim, kod italijanskog stanovništva 67% pacijenata sa FALS i samo 4,7% pacijenata sa SALS je imalo gensku mutaciju (Chiò A et al., 2012). Jedno od mogućih objašnjenja za ove razlike moglo bi se pripisati nedostatku adekvatnih podataka kod naših pacijenata o pozitivnoj porodičnoj anamnezi ne samo za ALS već i druge neurodegenerativne bolesti. Upravo zbog toga vrlo je važno da se u narednom periodu svi ALS pacijenti detaljno klinički i genetski ispituju, radi utrdjivanja/formiranja realne genetske mape na teritoriji Srbije.

SOD1 pozitivni i SOD1 negativni ALS pacijenti u našoj grupi pokazali su određeni stepen kognitivnog oštećenja koji je restrovan već primenom MMSE. Rezultati neuropsihološke procene kod ove grupe genetskih ALS pacijenata ukazuju na određene specifičnosti u poređenju sa prethodnim rezultatima drugih autora (Wheaton MW et al., 2007). SOD1 pozitivni pacijenti su pokazali disegzekutivni sindrom, meren pomoću Stroop-ovog testa, što ukazuje na oštećenje frontalnih režnjeva mozga. S druge strane, SOD1 negativni pacijenti pokazali su širi kognitivni poremećaj, uključujući egzekutivnu i vizuospacijalnu disfunkciju, kao i deficit vizuospacijalnog pamćenja, koji bi mogao ukazivati na poremećaj frontalnih režnjeva i zadnjih kortikalnih regija. Bolji

rezultati naših ispitanika sa SOD1 mutacijom u poređenju sa pacijentima sa drugim mutacijama su u skladu sa nalazima Wicks-a i sar. (Wicks P et al., 2009), koji su takođe potvrdili relativnu poštedu kognicije kod SOD1 pozitivnih pacijenata u poređenju sa SOD1 negativnim ALS pacijentima. Međutim, iako je početak bolesti u našim i Wicks-ovim grupama bio sličan ( $48.6 \pm 9.7 / 50.9 \pm 10.9$ ), moramo naglasiti da ovi autori nisu našli disegzekutivni sindrom kod SOD1 pozitivnih pacijenata za razliku od nas. S obzirom na veliki broj otkrivenih SOD1 pozitivnih pacijenata, naš primarni cilj bio je da definišemo neuropsihološki profil u ovoj grupi genetski pozitivnih ALS pacijenata iz naše kohorte.

Zanimljivo je da nismo pronašli upadljiviju disfunkciju temporalnog režnja kod naših genetski pozitivnih pacijenata. Naši rezultati nisu u skladu sa nalazima Rakowicza i Hodges-a (Rakowicz WP & Hodges JR., 1998), koji su pokazali da je ALS povezan sa dismnestičkim poremećajima i poremećajima govora - pronalaženjem reči (Abrahams S et al., 2005; Phukan J et al., 2007). Mogući razlog za ovo odstupanje može biti u činjenici da je ovaj autor uglavnom testirao SALS pacijente.

Značajno ograničenje ove studije je relativno mali uzorak, naročito za SOD1 negativnu grupu, što je predstavljalo prepreku za precizniju statističku evaluaciju i tumačenje rezultata

U našem ispitivanju je pokazano da je raniji početak bolesti povezan sa dužim preživljavanjem obolelih. Postoji opšti konsenzus da je starost značajan prognostički faktor za ALS, kao i da je duže vreme preživljavanja u korelaciji sa mlađim uzrastom na početku bolesti (Chio A et al., 2009; Alcaz S et al., 1996; Czaplinski A et al., 2006). Eisen i saradnici su pokazali da pacijenti sa početkom pre 50. godine imaju značajno duže trajanje bolesti u poređenju sa onima koji su imali početak posle 70. godine (del Aguila MA et al., 2003; Chio A et al., 2009; Czaplinski A et al., 2006; Eisen A et al., 1993; Turner MR et al., 2012; Haverkamp LJ et al., 1995; Lee JR et al., 1995; Magnus T et al., 2002). Mehanizam koji se nalazi u osnovi ove pojave nije poznat. Jedno od mogućih objašnjenja je da mlađi pacijenti mogu bolje da kompenzuju smanjenu mišićnu funkciju od pacijenata sa kasnijim početkom koji imaju manji broj motornih neurona (Czaplinski A et al., 2006). Međutim, kasniji početak bolesti ne isključuje duže preživljavanje.

Rezultati naše studije ukazali su da nije bilo značajne razlike u obrascu preživljavanja muškaraca i žena, što je slično drugim istraživanjima (Czaplinski A et al., 2006; Magnus T et al., 2002; Forbes R B et al., 2004). Rezultati većine studija pokazali su da je spinalni početak bolesti, češće nego bulbarni početak, bio prediktor dužeg preživljavanja, što je u skladu i sa našim nalazima (del Aguila MA et al., 2003; Chio A et al., 2009; Logroscino G et al., 2010; Millul A et al., 2005; Czaplinski A et al., 2006). Pacijenti sa bulbarnim početkom mogu imati kraće preživljavanje zbog ranijeg nastanka slabosti respiratornih mišića, veće stope respiratornih komplikacija, nehranjenosti i dehidracije (Chio A et al., 2009; Traynor B.J et al., 2003; Czaplinski A et al., 2006; Haverkamp LJ et al., 1995; Forbes R B et al., 2004). Nismo uspjeli da potvrdimo nezavisni efekat lokalizacije početka simptoma na preživljavanje, za razliku od drugih autora (Chio A et al., 2009; Czaplinski A et al., 2006). Kao i u studijama drugih autora, nismo potvrdili ni da početno zahvatanje GMN, DMN ili GMN + DMN utiče na preživljavanje (Czaplinski A et al., 2006; Haverkamp LJ et al., 1995).

U celokupnoj kohorti naših pacijenata sa ALS nismo utvrdili postojanje značajne povezanost dijagnostičkog kašnjenja sa preživljavanjem. Sa druge strane, mnoge studije su pokazale da duže dijagnostičko kašnjenje pozitivno utiče na preživljavanje kod ALS i da je u korelacijom sa boljom prognozom (Logroscino G et al., 2008; del Aguila MA et al., 2003; Chio A et al., 2009; Czaplinski A et al., 2006; Haverkamp LJ et al., 1995). Autori su prepostavili da pacijenti sa bržom progresijom bolesti imaju tendenciju da traže medicinsku pomoć ranije, dok se oni sa sporijom progresijom bolesti kasnije javljaju lekaru ili se polako prilagođavaju na prve simptomome pre nego što se jave neurologu.

Kada se razmotri klinički tok ALS, evaluacija funkcionalnog statusa je vrlo značajan parametar. Rezultati u mnogim studijama su pokazali da su niži ALSFRS-r skor i brza progresija bolesti su negativno povezani sa prognozom ALS (Kaufmann P et al., 2005; Rauchway AC et al., 2007). Naši podaci su u skladu sa ovim stavovima i pokazali su kraće preživljavanje kod pacijenata sa nižim ALSFRS-r skorom u trenutku postavljanja dijagnoze uključujući i SALS i FALS pacijente.

Zbog velike heterogenosti rezultata brojnih studija, još uvek nedostaju precizni podaci o prognozi ALS pacijenata sa udruženim neurološkim i ostalim

bolestima. U našoj studiji nismo uočili značajnu razliku u preživljavanju ALS pacijenata bez i sa udruženim oboljenjima.

Značajno bolje preživljavanje evidentirano je u grupi naših pacijenata koji su bili na terapiji riluzolom. Do danas, riluzol je jedini lek koji je pokazao da usporava tok ALS u četiri studije klase I (Turner MR et al., 2002; Bensimon G et al., 1994; Paillisse C et al., 2000; Bensimon G et al., 2002). Cochrane studija iz 2007. godine potvrdila je ove nalaze (Miller RG et al., 2007). Nažalost, rezultati o efikasnosti riluzola u brojnim opservacionim studijama kojima su obuhvaćene veće grupe pacijenata različitog životnog doba, koji su koristili riluzol u dužem vremenskom periodu, su kontraverzni i još uvek nije jasno da li je dejstvo leka ograničeno na ranu fazu bolesti i na neke specifične podgrupe pacijenata. Iako su naši rezultati u skladu sa rezultatima koji su pokazali pozitivan uticaj riluzola na stopu preživljavanja kod pacijenata sa ALS (Traynor BJ et al., 2003; Mitchell JD et al., 2006), trebalo bi ih uzeti sa određenom rezervom, zbog relativno malog broja pacijenata. Za razliku od terapije riluzolom, nismo dokazali da je primena NIV ili PEG imala pozitivan uticaj na preživljavanje kod naših pacijenata, što se delom može objasniti činjenicom da su ove suportivne terapijske metode bile retko korišćene kod naših pacijenata sa ALS.

Preživljavanje pacijenata sa genetski potvrđenom formom bolesti se ne razlikuje u odnosu na preživljavanje pacijenata sa SALS u analiziranoj kohorti. Prosečna dužina trajanja bolesti kod ove grupe je slična kao i kod SALS, iako su registrovane genetski determinisane forme bolesti sa dužim (od 7-20 godina) ili kraćim preživljavanjem (od oko 1-2 godine). Čak i različite mutacije u jednom istom genu mogu dati različito preživljavanje. U Velikoj Britaniji i Japanu najčešće opisivana mutacije u SOD1 genu su I113T i H46R, koje se karakterišu blažim kliničkim znacima ALS i preživljavanjem od preko 20 godina od početka bolesti. A4V, H43R, L84V, G85R, N86S, G93A i R115C mutacije u SOD1 genu su povezane sa brzim napredovanjem bolesti i preživljavanjem koje u najvećem broju slučajeva ne prelazi 3 godine, dok su forme bolesti sa mutacijama G93C, D90A (homozigotna) i H46R udružene da dužim preživljavanjem (u nekim slučajevima i više od 10 godina nakon početka bolesti) (Li et al, 2016).

Jasno je da postoje potencijalna ograničenja naše studije. Moguće je da kliničke studije generalno predstavljaju donekle iskrivljenu sliku ALS populacije zbog nedovoljnog procenta dijagnostikovanih pacijenata, posebno starijih starosnih grupa. Osim toga, drugi faktori koje nismo sistematično istraživali u vreme dijagnoze, kao što su kognitivni status i kompletno ispitivanje plućnih funkcija, takođe mogu biti prognostički prediktori. Dodatni problem je bio da zbog velikih troškova, nisu svi pacijenti bili lečeni riluzolom, dok su neki bili na leku samo nekoliko meseci. Slično se može reći za korišćenje NIV i implantaciju PEG.

U našem istraživanju su analizirane strukturne i funkcionalne promene mozga i cervikalne kičmene moždine dobijene primenom nekonvencionalne MR u uzorku SALS i ALS pacijenata koji su bili nosioci mutacije SOD1 gena. Rezultati su ukazali da ALS SOD1 pozitivni pacijenti kao i SALS pacijenti nisu pokazivali nikakvo značajno kortikalno istanjenje u poređenju sa zdravim kontrolama. Mikrostrukturna oštećenja kortikospinalnog trakta i povećana funkcionalna povezanost precentralnog korteksa registrovana su samo kod SALS pacijenata. Pacijenti sa SALS i SOD1 su imali slične mikrostrukturne promene cervikalne kičme merene pomoću magnetizacionog transfera. Ipak, analiza poprečnog preseka cervikalne kičmene pokazala je značajnu atrofiju kičmene moždine kod pacijenata sa SOD1 ALS u poređenju sa SALS.

Nekoliko MR studija koje su procenjivale pacijente sa ALS SOD1 mutacijama, rađene su na malom uzorku pacijenata (pre svega nosilaca homozigotne mutacije D90A najčešće opisivana SOD1 mutacija u Evropi). Ove studije su pokazale relativnu očuvanost premotornog/ motornog korteksa (Turner MR et al., 2007), a nije bilo ni značajnog mikrostrukturnog oštećenja puteva bele mase (Stanton BR et al., 2009), posebno u okviru kortikospinalnog trakta (Blain CR et al., 2011). Naša studija potvrđuje ove nalaze u većoj kohorti pacijenata sa različitim SOD1 mutacijama. Ipak, funkcionalna anizotropija (FA) kortikospinalnog trakta u grupi pacijenata sa ALS SOD1 je pokazala vrednosti između onih dobijenih u grupi SALS pacijenta i zdravih kontrola. Čak je uočen i trend razlike kada se upoređuje FA levog kortikospinalnog trakta. Studije sprovedene na asimptomatskim nosiocima SOD1 mutacije su u skladu sa ovim nalazom. U jednoj studiji su pronađene promene u zadnjem kraku kapsule interne (Ng MC et al., 2008). Novija *diffusion tensor* (DT) merenja (Menke RA et al., 2016)

motornih puteva mozga u 12 asimptomatskih nosilaca SOD1 mutacije, pokazala su da su ovi ispitanici imali kvalitativne vrednosti merenja između pacijenata sa SALS i zdravih kontrola. Stoga je moguće da bi se na većem uzorku ALS SOD1 pacijenta mogla zapaziti značajnija oštećenja na motornim putevima bele mase, iako su ove promene značajno manje izražene nego kod SALS pacijenata.

Ovo je prva studija koja je pokazala odsustvo aberantne povezanosti u senzomotornoj mreži u grupi ALS SOD1 pacijenata. Ovaj nalaz je u skladu sa nedavnom studijom koja je procenjivala povezanost senzorimotorne mreže u stanju mirovanja kod nosilaca mutacije SOD1 (Menke RA et al., 2016). I strukturni i funkcionalni rezultati MR mozga iz naše studije podržavaju hipotezu da su patološka oštećenja senzomotorne mreže u mozgu kod ALS SOD1 pacijenat blaža nego kod SALS što je u skladu i sa patohistološkim nalazima (Cudkowicz ME et al., 1998; Ince PG et al., 1998).

Važno je istaći da nismo pronašli bilo kakvo značajno istanjenje korteksa kod SALS pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolama. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima većine prethodnih MR studija koje pokazuju atrofiju motornih i ekstrapotornih kortikalnih regiona kod pacijenata sa SALS (Agosta F et al., 2016; Walhout R et al., 2015). Ovo odstupanje je verovatno uzrokovano malim SALS uzorkom u našoj grupi ispitanika. Kada uporedimo rezultate analize debljine korteksa sa DT nalazima i nalazima povezanosti moždanih regiona dobijenim pomoću funkcionalne MR u istom uzorku, možemo zaključiti da merenja debljine korteksa ima manju senzitivnost u poređenju sa drugim MR modalitetima u diferencijaciji grupe ispitanika (ALS SOD1, SALS i zdrave kontrole).

Analiza cervikalne kičmene moždine pokazala je izraženiju atrofiju u grupi ALS SOD1 pacijenata u poređenju sa SALS pacijentima, iako su vrednosti magnetizacionog transfera bile slične u ove dve grupe. Ovaj nalaz je naročito upečatljiv jer je u kontrastu sa relativnim očuvanjem moždanih mreža kod istih pacijenata. Štaviše, utvrđeno je da funkcionalno oštećenje kod SALS pacijenata korelira sa FA nalazom kortikospinalnog trakta i poprečnim presekom kičmene moždine, dok je kod ALS SOD1 pacijenata funkcionalno oštećenje (mereno ALSFRS-r skorom) korelisalo samo sa poprečnim presekom kičmene moždine. Takođe je zapaženo da je trajanje bolesti bilo povezano sa dijametrom poprečnog preseka kičmene moždine u obe grupe pacijenata, što ukazuje na

to da duži tok bolesti dovodi do atrofije kičmene moždine. Promene u odnosima neurometabolita u cervikalnoj kičmenoj moždini prethodno su dokazane kod asimptomatskih SOD1 ispitanika, bez kliničkih i elektromiografskih znakova bolesti (Carew JD et al., 2011). Sva ova zapažanja ukazuju na to da se neurodegeneracija u ALS SOD1 verovatno primarno javlja u kičmenoj moždini kako u presimptomatskoj fazi tako i tokom simtomatskih stadijuma bolesti. Objektivna i tačna procena prisustva i obima oštećenja kičmene moždine može doprineti značaju korelacije između kliničkih i MR nalaza kod različitih formi ALS.

Uprkos tome što je ovo istraživanje studija preseka, otkrića dobijena iz analize MR mozga i kičmene moždine mogu ukazati na to da patološke promene kod ALS SOD1 prate drugačiji obrazac širenja u poređenju sa slučajevima SALS sa patohistološkom osnovnom TDP43. Neki skorašnji dokazi potvrđuju hipotezu da SALS može biti prvenstveno poremećaj neokorteksa, uz naknadnu anterogradnu degeneraciju kortikospinalnog puta i alfa-motoneurona kičmene moždine (Braak H et al., 2017). Nasuprot tome, prethodne studije pokazale su relativno blago oštećenje motornog korteksa kod ALS SOD1 pacijenata (Cudkovicz ME et al, 1998; Ince PG et al., 1998), a nedavno je utvrđeno da se patološki agregati akumuliraju predominantno u motornim neuronima kičmene moždine (Da Cruz S et al., 2017). U skladu sa "dying-back" teorijama kod ALS SOD1 (Ravits J et al., 2007), kliničke studije su pokazale da su izražena spastičnost i bulbarni početak neuobičajene osobine u ovoj formi bolesti, kao i da se mogu primetiti atipični fenotipovi sa senzornim poremećajima ili čistim oštećenjem donjeg motoneurona (Andersen PM et al., 1996; Cudkovicz ME et al., 1998; Ikeda M et al., 1995). ALS SOD1 pacijenti u našoj studiji nisu pokazali veću učestalost simptoma donjeg motoneurona u poređenju sa SALS pacijentima. Međutim, pacijenti su u ovu studiju uključeni nakon dužeg trajanja bolesti, tako da je moguće da su na početku bolesti imali uglavnom oštećenje donjeg motornog neurona, a da su potom verovatno razvili oštećenje gornjeg motornog neurona. Longitudinalne kliničke i MR studije koje će uključiti presimptomatske nosioce mutacije u SOD1 genu su potrebne da bi se razjasnio obrazac patološkog širenja kod ovih pacijenata.

Neuroradiološka studija u ovoj kohorti nije bez ograničenja. Kao prvo, MR kičmene moždine nije rađena kod zdravih kontrola. Ipak, analiza je bila fokusirana na procenu razlika između ALS SOD1 grupe i SALS pacijenata, a glavni zaključci potiču

upravo iz ovog poređenja. Štaviše, prethodne studije su dosledno pokazale značajnu atrofiju i smanjen magnetizacioni transfer u cervikalnoj kičmi SALS pacijenata (El Mendili MM et al., 2014; Branco LM et al., 2014). Drugo, SALS grupa bila je relativno mala. Treće, nije obrađena grupa pacijeta sa drugim mutacijama u osnovi bolesti. I na kraju, dizajn poprečnog preseka studije nije omogućio čvrste zaključke o toku bolesti kod ALS SOD1 pacijenata.

U zaključku, ova studija o MR karakteristikama kod ALS SOD1 i SALS pacijenata ukazala je na predilekciju patoloških promena u kičmenoj moždini kod SOD1 ALS pacijenata. Evaluacija površina poprečnog preseka cervikalnog dela kičmene moždine može biti značajan marker kliničke onesposobljenosti i napredovanja bolesti u ovoj podgrupi ALS pacijenata. Potrebne su veće, longitudinalne studije, kao i studije koje bi uključile presimptomatske nosioce SOD1 mutacija i pacijente sa različitim SOD1 mutacijama, kako bi se potvrdile pretpostavke proizašle iz ove studije.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Ukupno 37 (15,4%) od 241 pacijenta imalo je jednu ili više mutacija u testiranim ALS genima. Među njima je 17 (7,1%) pacijenata imalo pozitivnu porodičnu anamnezu. U genetskoj grupi 27 pacijenta je imalo mutaciju u SOD1 genu (72,9%), šest pacijenata je imalo mutaciju u genu za c9orf72 (16,2 %), dva pacijenta mutaciju u ANG genu (5,4%), jedan pacijent je imao mutaciju u TDP43 genu (2,7%), a jedan kombinovanu mutaciju c9orf72, FUS i ANG (2,7%).

2. Pacijenti sa genetskom ALS i sporadičnom ALS se nisu razlikovali prema starosti na početku bolesti. U grupi genetskih ALS dijagnostičko kašnjenje je bilo u proseku godinu dana duže. Atipični klinički znaci (objektivni senzitivni ispadi i sfinkterijalne smetnje) bili su značajno češći u grupi genetski determinisanih pacijenata. Respiratorna insuficijencija je bila češća kod pacijenta sa genetskom ALS, ali su ovi pacijenti imali i duže trajanje bolesti u poređenju sa sporadičnom ALS.

3. Svi SOD1 pozitivni pacijenti imali su spinalni početak bolesti i u većini slučajeva (85,2%) prvi simptomi su bili na donjim ekstremitetima. Bulbarni početak je bio češći kod SOD1 negativnih familijarnih ALS pacijenata. Senzitivni poremećaji su bili češći kod SOD1 pozitivnih, a poremećaji sfinktera registrovani su samo u SOD1 pozitivnoj grupi.

4. Prediktori lošijeg preživljavanja u ispitivanoj ALS kohorti su bili: bulbarni početak bolesti, ženski pol, kao i veći stepen onesposobljenosti u trenutku postavljanja dijagnoze (niži ALSFRS-r skor). Nije zapaženo duže preživljavanje u grupi pacijenta koji su imali verifikovanu mutaciju u odnosu na sporadične slučajeve bolesti, ali je prisutvo SOD1 mutacija u odnosu na ne-SOD1 mutacije ukazivalo je na duže preživljavanje u SOD1 grupi.

5. Opšti kognitivni skrining je pokazao lošije rezultate kod ALS u poređenju sa zdravim kontrolama. SOD1 pozitivni pacijenti su postigli znatno niži rezultat na

egzekutivnom testu nego zdrave kontrole. SOD1 negativni pacijenti su pokazali lošiji rezultat na više testova uključujući: opšti intelektualni nivo, verbalnu i vizuospatijalnu memoriju, egzekutivnu funkciju, a u manjoj meri i pažnju i jezičke funkcije.

6. Nisu utvrđene značajne razlike između pacijenata sa ALS SOD1, SALS pacijenata i zdravih kontrola u debljini korteksa. U poređenju sa zdravim kontrolama, SALS pacijenti imali su oštećenje kortikospinalnog puta. Pacijenti sa ALS SOD1 imali su promene koje su po registrovanim vrednostima bile između zdravih kontrola i SALS pacijenata. Posmatrajući sensorimotornu mrežu, SALS pacijenti su pokazali povećanu funkcionalnu povezanost precentralnog korteksa u poređenju sa kontrolama. ALS SOD1 pacijenti imali su značajno smanjenje srednje vrednosti površine poprečnog preseka cervikalne kičmene moždine od nivoa C2 do nivoa C7 u odnosu na SALS pacijente.

7. Stepen onesposobljenosti je bio u korelaciji sa mikrostrukturnim oštećenjem kortikospinalnog puta u grupi pacijenata sa SALS, kao i sa srednjom vrednošću poprečnog preseka kičmene moždine i sa segmentnim površinama od nivoa C3 do nivoa C6 u grupi pacijenata sa ALS SOD1 i SALS. Između trajanja bolesti i srednje vrednosti površine poprečnog preseka vratne kičmene moždine utvrđena je pozitivna korelacija kod pacijenata sa ALS SOD1 i SALS pacijenata. Takođe, trajanje bolesti je bilo u korelaciji i sa segmentnim površinama kičmene moždine od C2 do C6 u obe ALS grupe.

8. Prisustvo atipičnih simptoma kod ALS kao i duže trajanje bolesti treba da pobude sumnju da se radi o hereditarnoj ALS. S obzirom na učestalost mutacija u Srbiji, savetuje se skrining SOD1 gena (i to pre svega ciljanih mutacija – L144F, D90A i A145G) i c9orf72 lokusa.

## 7. LITERATURA

- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T, Itoyama Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1995;199(2):152-4.
- Abrahams S, Goldstein LH, Al-Chalabi A, Pickering A, Morris RG, Passingham RE, Brooks DJ, Leigh PN. Relation between cognitive dysfunction and pseudobulbar palsy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:464-72.
- Abrahams S, Goldstein LH, Simmons A, Brammer M, Williams SC, Giampietro V, Leigh PN. Word retrieval in amyotrophic lateral sclerosis. A functional magnetic resonance imaging study. *Brain* 2004;127:1507-17.
- Abrahams S, Leigh PN, Goldstein LH. Cognitive change in ALS: a prospective study. *Neurology* 2005 ;64(7):1222-6.
- Abrahams S, Leigh PN, Harvey A, Vythelingum GN, Gris  D, Goldstein LH. Verbal fluency and executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuropsychologia* 2000;38:734-47.
- Agosta F, Ferraro PM, Riva N, Spinelli EG, Domi T, Carrera P, Copetti M, Falzone Y, Ferrari M, Lunetta C, Comi G, Falini A, Quattrini A, Filippi M. Structural brain correlates of cognitive and behavioral impairment in MND. *Hum Brain Mapp* 2016;37:1614-1626.
- Alcaz S, Jarebinski M, Pekmezovic T, Stevic-Marinkovic Z, Pavlovi  S, Apostolski S. Epidemiological and clinical characteristics of ALS in Belgrade, Yugoslavia. *Acta Neurol Scand* 1996;94:264-268.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology.* 2001;57(7):1282-9.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Dsm-IV-TR.* Washington, DC; 2000. Print.
- Anand P, Parrett A, Martin J, Zeman S, Foley P, Swash M, Leigh PN, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE, et al. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal

- cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med.* 1995;1(2):168-72.
- Andersen PM, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B, Marklund SL. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain.* 1996;119 ( Pt 4):1153-72.
  - Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006 ;6(1):37-46.
  - Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(3):602-11.
  - Armon C. Motor neuron disease. In PB Gorelick, M Alter (eds), *Handbook of Neuroepidemiology*, New York: Marcel Dekker, 1994; 407-456.
  - Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger V. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain.* 2014;137(Pt 8):2329-45.
  - Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(5):629-41.
  - Barson FP, Kinsella GJ, Ong B, Mathers SE. A neuropsychological investigation of dementia in motor neuron disease (MND). *J Neurol Sci* 2000;180:107-13.
  - Battistini S, Ricci C, Giannini F, Calzavara S, Greco G, Del Corona A, Mancuso M, Battistini N, Siciliano G, Carrera P. G41S SOD1 mutation: a common ancestor for six ALS Italian families with an aggressive phenotype. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11: 210–5.

- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH Jr. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1997;42(4):644-54.
- Beard JD, Kamel F. Military service, deployments, and exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology and survival. *Epidemiol Rev* 2015;37:55-70.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-37.
- Beckmann CF, Smith SM. Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging.* 2004;23(2):137-52.
- Bede P, Bokde AL, Byrne S, Elamin M, Fagan AJ, Hardiman O. Spinal cord markers in ALS: diagnostic and biomarker considerations. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Motor Neuron Dis.* 2012;13:407-15.
- Bede P, Hardiman O. Lessons of ALS imaging: Pitfalls and future directions - A critical review. *Neuroimage Clin.* 2014 ;4:436-43.
- Beeldman E, Raaphorst J, Klein Twennaar M, de Visser M, Schmand BA, de Haan RJ. The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(6):611-9.
- Beghi E, Logroscino G Chiò A c, Hardiman A, Mitchell D, Swingler R, Traynor BJ; EURALS Consortium. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1762:1150-1157.
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci.* 2001;191(1-2):25-33.
- Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V; Riluzole/ALS Study Group II. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2002;249:609-615.

- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:585–591.
- Blain CR, Brunton S, Williams VC, Leemans A, Turner MR, Andersen PM, Catani M, Stanton BR, Ganesalingham J, Jones DK, Williams SC, Leigh PN, Simmons A. Differential corticospinal tract degeneration in homozygous 'D90A' SOD-1 ALS and sporadic ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:843-849.
- Braak H, Ludolph AC, Neumann M, Ravits J, Del Tredici K. Pathological TDP-43 changes in Betz cells differ from those in bulbar and spinal alpha-motoneurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2017;133:79-90.
- Branco LM, De Albuquerque M, De Andrade HM, Bergo FP, Nucci A, Franca MC, Jr. Spinal cord atrophy correlates with disease duration and severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014;15:93-97.
- Bromberg MB. MUNIX and MUNE in ALS. *Clin Neurophysiol.* 2013;124(3):433-4.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(5):293-9.
- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci.* 1994 ;124 Suppl:96-107.
- Brooks BR. Earlier is better: the benefits of early diagnosis. *Neurology.* 1999;53(8 Suppl 5):S53-4.
- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity

- of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*. 1998 ;281(5384):1851-4.
- Byrne S, Elamin M, Bede P, Hardiman O. Absence of consensus in diagnostic criteria for familial neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 ;83(4):365-7.
  - Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman O. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 ;82(6):623-7.
  - Carew JD, Nair G, Andersen PM, Wu J, Gronka S, Hu X, Benatar M. Presymptomatic spinal cord neurometabolic findings in SOD1-positive people at risk for familial ALS. *Neurology* 2011;77:1370-1375.
  - Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*. 2000;20(1):240-50.
  - Carvalho MD, Swash M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(1):53-7.
  - Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 1999;169(1-2):13-21.
  - Cedarbaum JM, Stambler N. Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials. *J Neurological Sciences* 1997;152 (Suppl 1): S1-S9.
  - Chio A , Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG; Eurals Consortium. Prognostic factors in ALS: A critical review *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2009;10:310-323.
  - Chiò A, Calvo A, Mazzini L, Cantello R, Mora G, Moglia C, Corrado L, D'Alfonso S, Majounie E, Renton A, Pisano F, Ossola I, Brunetti M, Traynor BJ, Restagno G; PARALS. Extensive genetics of ALS: a population-based study in Italy. *Neurology* 2012;79(19):1983-9.

- Chiò A, Calvo A, Moglia C, Ossola I, Brunetti M, Sbaiz L, Lai SL, Abramzon Y, Traynor BJ, Restagno G. A de novo missense mutation of the FUS gene in a "true" sporadic ALS case. *Neurobiol Aging* 2011;32(3):553.e23-6.
- Chio A, Pagani M, Agosta F, Calvo A, Cistaro A, Filippi M. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol* 2014;13:1228-1240.
- Chio A, Traynor BJ, Lombardo F, Fimognari M, Calvo A, Ghiglione P, Mutani R, Restagno G. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Neurology* 2008;70:533–537.
- Chou SM, Wang HS, Komai K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat.* 1996 ;10(3-4):249-58.
- Cohen-Adad J, El Mendili MM, Morizot-Koutlidis R, Lehericy S, Meininger V, Blanco S, et al. Involvement of spinal sensory pathway in ALS and specificity of cord atrophy to lower motor neuron degeneration. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degen.* 2012;14:30–8.
- Cooper-Knock J, Kirby J, Highley R, Shaw PJ. The Spectrum of C9orf72-mediated Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2015;12(2):326-39.
- Corbo M, Hays AP. Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992;51(5):531-7.
- Corcia P, Couratier P, Blasco H, Andres CR, Beltran S, Meininger V, Vourc'h P. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2017;173(5):254-262.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993; 29;262(5134):689-95.
- Coyne AN, Zaepfel BL, Zarnescu DC. Failure to Deliver and Translate-New Insights into RNA Dysregulation in ALS. *Front Cell Neurosci.* 2017 ;11:243.
- Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* 2007;68:1002-7.



- Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Chen C, Hedley-Whyte ET, Brown RH, Jr. Limited corticospinal tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis subjects with the A4V mutation in the copper/zinc superoxide dismutase gene. *Ann Neurol* 1998;43:703-710.
- Czaplinski A, Yen AA, Appel SH. Amyotrophic lateral sclerosis: early predictors of prolonged survival. *J Neurol* 2006;253:1428-36.
- Da Cruz S, Bui A, Saberi S, Lee SK, Stauffer J, McAlonis-Downes M, Schulte D, Pizzo DP, Parone PA, Cleveland DW, Ravits J.. Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. *Acta Neuropathol* 2017;134:97-111.
- de Carvalho M, Swash M. Fasciculation potentials and earliest changes in motor unit physiology in ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(9):963-8.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72(2):245-56.
- del Aguila MA, Longstreth WT Jr, McGuire V, Koepsell TD, van Belle G. Prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Neurology* 2003; 60: 813– 819.
- Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage*. 2006;31(3):968-80.
- Dhaliwal GK, Grewal RP. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport*. 2000;11(11):2507-9.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*. 1999;81(3):163-221.
- Drory V, Artmonov I. Earlier onset and shorter survival of amyotrophic lateral sclerosis in Jewish patients of North African origin - A clue to modifying genetic factors? *Journal of the Neurological Sciences* 2007;258:39–43.

- Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(5):523-30.
- EFNS Task Force on Diagnosis and Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis:, Andersen PM, Abrahams S, Borasio GD, de Carvalho M, Chio A, Van Damme P, Hardiman O, Kollewe K, Morrison KE, Petri S, Pradat PF, Silani V, Tomik B, Wasner M, Weber M. EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS)--revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol.* 2012;19(3):360-75.
- Eisen A, Schulzer M, MacNeil M, Pant B, Mak E. Duration of amyotrophic lateral sclerosis is age dependent. *Muscle Nerve* 1993;16:27–32.
- El Mendili MM, Cohen-Adad J, Pelegrini-Issac M, Rossignol S, Morizot-Koutlidis R, Marchand-Pauvert V, Iglesias C, Sangari S, Katz R, Lehericy S, Benali H, Pradat PF. Multi-parametric spinal cord MRI as potential progression marker in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2014;9:e95516.
- Elamin M, Phukan J, Bede P, Jordan N, Byrne S, Pender N, Hardiman O. Executive dysfunction is a negative prognostic indicator in patients with ALS without dementia. *Neurology* 2011;76:1263–9
- Elamin M, Bede P, Byrne S, Jordan N, Gallagher L, Wynne B, O'Brien C, Phukan J, Lynch C, Pender N, Hardiman O. Cognitive changes predict functional decline in ALS: a population-based longitudinal study. *Neurology.* 2013 ;80(17):1590-7.
- Elliott JL, Snider WD. Motor neuron growth factors. *Neurology.* 1996;47(4 Suppl 2):S47-53.
- Eugene Y. Achi and Stacy A. Rudnicki. ALS and Frontotemporal Dysfunction: A Review. *Neurol Res Int* 2012;1-9.
- Farina C, Aloisi F, Meinel E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007 ;28(3):138-45.
- Felbecker A, Camu W, Valdmanis PN, Sperfeld AD, Waibel S, Steinbach P, Rouleau GA, Ludolph AC, Andersen PM. Four familial ALS pedigrees discordant for two SOD1 mutations: are all SOD1 mutations pathogenic? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81(5):572-7.

- Ferguson TA, Elman LB. Clinical presentation and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRehabilitation*. 2007;22(6):409-16.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH Jr, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1997;69(5):2064-74.
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carrì MT. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13860-5.
- Filippini N, MacIntosh BJ, Hough MG, Goodwin GM, Frisoni GB, Smith SM, Matthews PM, Beckmann CF, Mackay CE. Distinct patterns of brain activity in young carriers of the APOE-epsilon4 allele. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(17):7209-14.
- Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD, Lynch PG. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 1996;19(6):797-8.
- Floeter MK, Mills R. Progression in primary lateral sclerosis: a prospective analysis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(5-6):339-46.
- Foerster BR, Dwamena BA, Petrou M, Carlos RC, Callaghan BC, Churchill CL, Mohamed MA, Bartels C, Benatar M, Bonzano L, Ciccarelli O, Cosottini M, Ellis CM, Ehrenreich H, Filippini N, Ito M, Kalra S, Melhem ER, Pyra T, Roccatagliata L, Senda J, Sobue G, Turner MR, Feldman EL, Pomper MG. Diagnostic accuracy of diffusion tensor imaging in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Acad Radiol*. 2013;20(9):1099-106.
- Foerster BR, Welsh RC, Feldman EL. 25 years of neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(9):513-24.
- Folstein M, Folstein SE, McHugh PR. Mini-Mental State a Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *Journal of Psychiatric Research* 1975;12:189-98.

- Forbes R B, Colville S, Cran G W, Swingler R J. Unexpected decline in survival from amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1753–1755.
- Frank B, Haas J, Heinze HJ, Stark E, Münte TF. Relation of neuropsychological and magnetic resonance findings in amyotrophic lateral sclerosis: evidence for subgroups. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99:79-86.
- Freischmidt A, Müller K, Ludolph AC, Weishaupt JH, Andersen PM. Association of Mutations in TBK1 With Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *JAMA Neurol.* 2017 ;74(1):110-113.
- Gellera C, Colombrita C, Ticozzi N, Castellotti B, Bragato C, Ratti A, Taroni F, Silani V. Identification of new ANG gene mutations in a large cohort of Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 2008;9(1):33-40.
- Giannini F, Battistini S, Mancuso M, Greco G, Ricci C, Volpi N, Del Corona A, Piazza S, Siciliano G. D90A-SOD1 mutation in ALS: The first report of heterozygous Italian patients and unusual findings. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(1-2):216-9.
- Goldstein LH, Abrahams S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol* 2013;12:368–80.
- Goodglass H, Kaplan E. The assessment of aphasia and related disorders. Philadelphia, PA: Lea & Febiger 1983.
- Gordon PH, Goetz RR, Rabkin JG, Dalton K, McElhiney M, Hays AP, Marder K, Stern Y, Mitsumoto H. A prospective cohort study of neuropsychological test performance in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11:312–20.
- Gordon PH. Amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs.* 2011;25(1):1-15.
- Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, Morrison KE, Green A, Acharya KR, Brown RH Jr, Hardiman O. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006;38(4):411-3.

- Grossman AB, Wooley-Levine S, Bradley WG, Miller RG. Detecting neurobihevioral changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;252:1517-24.
- Guégan C, Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest.* 2003 ;111(2):153-61.
- Gurney ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED. Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1998;50(1):62-6.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia.* 1998;23(3):249-56.
- Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis *Nat Rev Neurol* 2011;7:639–649.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(6):574-81.
- Haverkamp LJ, Appel V, Apple S. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 1995;118:707–9.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1984;43(5):471-80.
- Horsfield MA, Sala S, Neema M, Absinta M, Bakshi A, Sormani MP, Rocca MA, Bakshi R, Filippi M. Rapid semi-automatic segmentation of the spinal cord from magnetic resonance images: application in multiple sclerosis. *Neuroimage.* 2010;50(2):446-55.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(3):1604-9.
- Ikeda M, Abe K, Aoki M, Sahara M, Watanabe M, Shoji M, St George-Hyslop PH, Hirai S, Itoyama Y. Variable clinical symptoms in familial amyotrophic

lateral sclerosis with a novel point mutation in the Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Neurology* 1995;45:2038-2042.

- Ince PG, Tomkins J, Slade JY, Thatcher NM, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:895-904.
- Jawdat O, Statland JM, Barohn RJ, Katz JS, Dimachkie MM. Amyotrophic Lateral Sclerosis Regional Variants (Brachial Amyotrophic Diplegia, Leg Amyotrophic Diplegia, and Isolated Bulbar Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Neurol Clin.* 2015;33(4):775-85.
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12571-6
- Jonsson PA, Bäckstrand A, Andersen PM, Jacobsson J, Parton M, Shaw C, Swingler R, Shaw PJ, Robberecht W, Ludolph AC, Siddique T, Skvortsova VI, Marklund SL. CuZn-superoxide dismutase in D90A heterozygotes from recessive and dominant ALS pedigrees. *Neurobiol Dis.* 2002 ;10(3):327-33.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40(5):572-4.
- Katz JS, Dimachkie MM, Barohn RJ. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Perspective. *Neurol Clin.* 2015 ;33(4):727-34.
- Katz JS, Wolfe GI, Andersson PB, Saperstein DS, Elliott JL, Nations SP, Bryan WW, Barohn RJ. Brachial amyotrophic diplegia: a slowly progressive motor neuron disorder. *Neurology.* 1999 ;53(5):1071-6.
- Kaufmann P, Levy G, Thompson J, Delbene ML, Battista V, Gordon PH, Rowland LP, Levin B, Mitumoto H. The ALSFRS<sub>r</sub> predicts survival time in an ALS clinic population. *Neurology* 2005;64:38-43.

- Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene* 2016;577(2):109-18.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 1992;140(3):691-707.
- Kazamel M, Sorenson EJ, McEvoy KM, Jones LK Jr, Leep-Hunderfund AN, Mauermann ML, Milone M. Clinical spectrum of valosin containing protein (VCP)-opathy. *Muscle Nerve.* 2016;54(1):94-9.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1991;50(3):263-77.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323(5918):1205-8.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34(4):383-94.
- Leblond CS, Gan-Or Z, Spiegelman D, Laurent SB, Szuto A, Hodgkinson A, Dionne-Laporte A, Provencher P, de Carvalho M, Orrù S, Brunet D, Bouchard JP, Awadalla P, Dupré N, Dion PA, Rouleau GA. Replication study of MATR3 in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2016 ;37:209.e17-209.e21.

- Lee JP, Gerin C, Bindokas VP, Miller R, Ghadge G, Roos RP. No correlation between aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase and cell death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2002;82(5):1229-38.
- Lee JR, Annegers JF, Appel SH. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis and the effect of referral selection. *J Neurol Sci* 1995;132:207–15.
- Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, Gallo JM, Weller RO, Anderton BH. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain.* 1991;114(Pt 2):775-88.
- Li HF, Wu ZY. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener.* 2016;5:3.
- Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 2000;288(5464):335-9.
- Li PP, Sun X, Xia G, Arbez N, Paul S, Zhu S, Peng HB, Ross CA, Koeppen AH, Margolis RL, Pulst SM, Ashizawa T, Rudnicki DD. ATXN2-AS, a gene antisense to ATXN2, is associated with spinocerebellar ataxia type 2 and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2016;80(4):600-15.
- Lipton SA, Rosenberg PA Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 199; 3;330(9):613-2.
- Logroscino G, Traynor B.J, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E; EURALS. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(4):385-390.
- Logroscino G., Traynor B, Hardiman O, Chio A, Couratier P, Mitchell JD, Swingler RJ, Beghi E; EURALS .Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Pschiatry* 2008;79:6-11.
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic laterals scloris patients cognitively normal? *Neurology.* 2003;60:1094-97.



- Ludolph A, Drory V, Hardiman O, Nakano I, Ravits J, Robberecht W, Shefner J; WFN Research Group On ALS/MND. A revision of the El Escorial criteria - 2015. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015;16(5-6):291-2.
- Luigetti M, Conte A, Madia F, Marangi G, Zollino M, Mancuso I, Dileone M, Del Grande A, Di Lazzaro V, Tonali PA, Sabatelli M. Heterozygous SOD1 D90A mutation presenting as slowly progressive predominant upper motor neuron amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci* 2009;30(6):517-20.
- Luisa Conforti F, Sprovieri T, Mazzei R, Patitucci A, Ungaro C, Zoccolella S, Magariello A, Bella VL, Tessitore A, Tedeschi G, Simone IL, Majorana G, Valentino P, Citrigno L, Gabriele A, Bono F, Monsurrò MR, Muglia M, Quattrone A. Further evidence that D90A-SOD1 mutation is recessively inherited in ALS patients in Italy. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009 ;10(1):58-60.
- Lysogorskaia EV, Abramycheva NY, Zakharova MN, Stepanova MS, Moroz AA, Rossokhin AV, Illarioshkin SN. Genetic studies of Russian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2015;17(1-2):135-41.
- Magnus T, Beck M, Giess R, Puls I, Naumann M, Toyka KV. Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival. *Muscle Nerve* 2002; 25:709-714.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pampillet R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium.; French research network on FTLD/FTLD/ALS.; ITALSGEN Consortium., Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral

- sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11(4):323-30.
- Masè G, Ros S, Gemma A, Bonfigli L, Carraro N, Cazzato G, Rolfo M, Zanconati F, Sepcic J, Jurjevic A, Pirulli D, Boniotto M, Zezlina S, Crovella S, Amoroso A. ALS with variable phenotypes in a six-generation family caused by Leu144Phe mutation in the SOD1 gene. *J Neurol Sci* 2001;191:11–18.
  - Menke RA, Agosta F, Grosskreutz J, Filippi M, Turner MR. Neuroimaging Endpoints in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017;14(1):11-23.
  - Menke RA, Proudfoot M, Wu J, Andersen PM, Talbot K, Benatar M, Turner MR. Increased functional connectivity common to symptomatic amyotrophic lateral sclerosis and those at genetic risk. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:580-588.
  - Millicamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, Guillot-Noël L, Russaouen O, Bruneteau G, Pradat PF, Le Forestier N, Vandenberghe N, Danel-Brunaud V, Guy N, Thauvin-Robinet C, Lacomblez L, Couratier P, Hannequin D, Seilhean D, Le Ber I, Corcia P, Camu W, Brice A, Rouleau G, LeGuern E, Meininger V. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 2010;47(8):554-60.
  - Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshew D, Johnston W, Kalra S, Katz JS, Mitsumoto H, Rosenfeld J, Shoesmith C, Strong MJ, Woolley SC; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2009;73(15):1218-26.
  - Millul A, Beghi E, Logroscino G, Micheli A, Vitelli E, Zardi A. Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in a population based registry. *Neuroepidemiology* 2005;25:114–28.

- Mitchell JD, O'Brien MR, Joshi M. Audit of outcomes in motor neuron disease (MND) patients treated with riluzole. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2006;7:67-77.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 1994;38(3):336-47.
- Ng MC, Ho JT, Ho SL, Lee R, Li G, Cheng TS, Song YQ, Ho PW, Fong GC, Mak W, Chan KH, Li LS, Luk KD, Hu Y, Ramsden DB, Leong LL. Abnormal diffusion tensor in nonsymptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis with a causative superoxide dismutase 1 mutation. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:8-13.
- Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 2008 ;22(11):1451-64.
- Offen D, Barhum Y, Melamed E, Embacher N, Schindler C, Ransmayr G Spinal cord mRNA profile in patients with ALS: comparison with transgenic mice expressing the human SOD-1 mutant. *J Mol Neurosci.* 2009;38(2):85-93.
- Oosthuysen B1, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeyer G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.* 2001 ;28(2):131-8.
- Oppenheim RW. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron.* 1996;17(2):195-7.
- Özoğuz A, Uyan Ö, Birdal G, Iskender C, Kartal E, Lahut S, Ömür Ö, Agim ZS, Eken AG, Sen NE, Kavak P, Saygı C, Sapp PC, Keagle P, Parman Y, Tan E, Koç F, Deymeer F, Oflazer P, Hanağası H, Gürvit H, Bilgiç B, Durmuş H, Ertaş

M, Kotan D, Akalın MA, Güllüoğlu H, Zarifoğlu M, Aysal F, Döşoğlu N, Bilguvar K, Günel M, Keskin Ö, Akgün T, Özçelik H, Landers JE, Brown RH, Başak AN. The distinct genetic pattern of ALS in Turkey and novel mutations. *Neurobiol Aging* 2015;36(4):1764.e9-18.

- Paillisse C, Lacomblez L, Dib M, Bensimon S, Garcia-Acosta S, Meininger V. Prognostic factors for survival in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with riluzole. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293-9.
- Pan L, Deng X, Ding D, Leng H, Zhu X, Wang Z. Association between the Angiogenin (ANG) K17I variant and amyotrophic lateral sclerosis risk in Caucasian: a meta-analysis. *Neurol Sci.* 2015;36(12):2163-8.
- Pan LS, Deng XB, Wang Z, Leng HL, Zhu XP, Ding D. Lack of association between the Angiogenin (ANG) rs11701 polymorphism and amyotrophic lateral sclerosis risk: a meta-analysis. *Neurol Sci.* 2016;37(5):655-62.
- Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(9):710-23.
- Patel AN, Sampson JB. Cognitive Profile of C9orf72 in Frontotemporal Dementia and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015 ;15(9):59.
- Pavlovic D. (2003) Dijagnosticki testovi u neuropsihologiji, II edn. Grafos, Beograd
- Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* 2011;10(3):253-63.
- Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2007;6(11):994-1003.
- Pioro EP. Proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000 ;1 Suppl 2:S7-16.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH Jr, Ludlow CL, Fischbeck KH. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.* 2003 ;33(4):455-6.

- Rakowicz WP, Hodges JR. Dementia and aphasia in motor neuron disease: an underrecognised association? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65(6):881-9.
- Rauchway AC, Kaiboriboon K, Bansal SK, Kulkantrakorn K, Guo X, Parks BJ, Hayat GR. A role for functional classification in the early identification of prognostic factors in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8(4):214-6.
- Raven J, Raven JC, Court JH. *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales*. 1998, updated 2003. Section 1: General Overview. San Antonio, TX: Harcourt Assessment.
- Raven J, Raven JC, Court JH. *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales*. Oxford Psychologists Press 1998.
- Ravits J, Paul P, Jorg C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 2007;68:1571-1575.
- Renton AE, Chio A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014;17:17-23.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium., Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72(2):257-68.
- Rey AL. *Examen clinique en psychologie*. Paris, F: Paris' Presses Universitaires de France 1964.

- Rodrigues CM1, Spellman SR, Solá S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC, Steer CJ. Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(4):463-71.
- Rohde GK, Barnett AS, Basser PJ, Marenco S, Pierpaoli C. Comprehensive approach for correction of motion and distortion in diffusion-weighted MRI. *Magn Reson Med.* 2004;51(1):103-14.
- Rojas-Rivera D, Caballero B, Zamorano S, Lisbona F, Hetz C. Alternative functions of the BCL-2 protein family at the endoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol.* 2010;687:33-47.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362(6415):59-62.
- Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):891-8.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1992; 28;326(22):1464-8.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005;433(7021):73-7.
- Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;65 Suppl 1:S3-9.
- Saeed M, Yang Y, Deng HX, Hung WY, Siddique N, Dellefave L, Gellera C, Andersen PM, Siddique T. Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. *Neurology.* 2009;72(19):1634-9.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 ;239(4839):487-91.
- Sangwan S, Eisenberg DS. Perspective on SOD1 mediated toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Postepy Biochem.* 2016;62(3):362-369.

- Sasaki S, Iwata M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 1996;204(1-2):53-6.
- Sasaki S, Komori T, Iwata M. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2000;100(2):138-44.
- Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27(4):257-74.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1996;139 Suppl:27-33.
- Schmidlin T, Kennedy BK, Daggett V. Structural changes to monomeric CuZn superoxide dismutase caused by the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutation A4V. *Biophys J*. 2009;97(6):1709-18
- Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;569(1-2):29-63.
- Senderek J, Garvey SM, Krieger M, Guergueltcheva V, Urtizberea A, Roos A, Elbracht M, Stendel C, Tournev I, Mihailova V, Feit H, Tramonte J, Hedera P, Crooks K, Bergmann C, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Lochmüller H, Seboun E, Weis J, Beckmann JS, Hauser MA, Jackson CE. Autosomal-dominant distal myopathy associated with a recurrent missense mutation in the gene encoding the nuclear matrix protein, matrin 3. *Am J Hum Genet*. 2009;84(4):511-8.
- Shaw IC, Fitzmaurice PS, Mitchell JD, Lynch PG. Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration*. 1995;4(4):391-6.
- Shaw PJ. Excitotoxicity and motor neurone disease: a review of the evidence. *J Neurol Sci*. 1994;124 Suppl:6-13.
- Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(8):1046-57.
- Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci*. 1996;18(5-6):492-8.

- Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Siddique T, Deng HX, Hung WY, Kato T, Asayama K. Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(4):481-90.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 2001;917(1):97-104.
- Siklós L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joó F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1996;39(2):203-16.
- Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. *Neuroimage* 2009;44:83-98.
- Snowden JS, Harris J, Richardson A, Rollinson S, Thompson JC, Neary D, Mann DM, Pickering-Brown S. Frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis: a clinical comparison of patients with and without repeat expansions in C9orf72. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013;14:172–176.
- Spree O, Strauss EA. *Compendium of neuropsychological tests* (2nd ed.). New York: Oxford University Press. 1998.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2008; 21;319(5870):1668-72.
- Stanton BR, Shihmar D, Turner MR, Williams VC, Williams SC, Blain CR, Giampietro VP, Catani M, Leigh PN, Andersen PM, Simmons A. Diffusion tensor imaging in sporadic and familial (D90A SOD1) forms of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66:109-115.
- Stevic Z, Kostic-Dedic S, Peric S, Dedic V, Basta I, Rakocevic-Stojanovic V, Lavrnic D. Prognostic factors and survival of ALS patients from Belgrade,



- Serbia. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2016;17(7-8):508-514.
- Stojkovic T, Stefanova E, Pekmezovic T, Peric S, Stevic Z. Executive dysfunction and survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Preliminary report from a Serbian centre for motor neuron disease. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2016;17(7-8):543-547.
  - Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. Handb Clin Neurol. 2016;138:225-38.
  - Tazir M, Bellatache M, Nouioua S, Vallat JM. Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease: from genes to phenotypes. J Peripher Nerv Syst. 2013;18(2):113-29.
  - Tiloca C, Ratti A, Pensato V, Castucci A, Sorarù G, Del Bo R, Corrado L, Cereda C, D'Ascenzo C, Comi GP, Mazzini L, Castellotti B, Ticozzi N, Gellera C, Silani V; SLAGEN Consortium. Mutational analysis of VCP gene in familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2012;33(3):630.e1-2.
  - Tomkins J, Usher P, Slade JY, Ince PG, Curtis A, Bushby K, Shaw PJ. Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neuroreport. 1998;9(17):3967-70.
  - Traynor B.J, Alexander M, Corr B, Frost E, Hardiman O. Effect of a multidisciplinary amyotrophic lateral sclerosis (ALS) clinic on ALS survival: a population based study, 1996–2000. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003;74:1258-1261.
  - Traynor BJ, Alexander M, Corr B, Frost E, Hardiman O. An outcome study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. A population-based study in Ireland, 1996-2000. J Neurol 2003;250:473-9.
  - Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. Arch Neurol. 2000;57(8):1171-6.
  - Turner MR, Bakker M, Sham P, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. Prognostic modelling of therapeutic interventions in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2002; 3:15–21.

- Turner MR, Barnwell J, Al-Chalabi A, Eisen A. Young-onset amyotrophic lateral sclerosis: historical and other observations. *Brain* 2012;135(9):2883-2891.
- Turner MR, Hammers A, Allsop J, Al-Chalabi A, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Andersen PM. Volumetric cortical loss in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8:343-347.
- Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, Nicholson G, Ravits J, Shaw PJ, Swash M, Talbot K, Traynor BJ, Van den Berg LH, Veldink JH, Vucic S, Kiernan M. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2013;12(3):310-22.
- Uccelli R, Binazzi A, Altavista P, Belli S, Comba P, Mastrantonio M, Vanacore N. Geographic distribution of amyotrophic lateral sclerosis through motor neuron disease mortality data. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(11):781-90.
- Vajda A, McLaughlin RL, Heverin M, Thorpe O, Abrahams S, Al-Chalabi A, Hardiman O. Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology.* 2017 ;88(10):991-999.
- van Blitterswijk M, Vlam L, van Es MA, van der Pol WL, Hennekam EA, Dooijes D, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH. Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. *PLoS One* 2012;7(11):e48983.
- van Es MA, Diekstra FP, Veldink JH, Baas F, Bourque PR, Schelhaas HJ, Strengman E, Hennekam EA, Lindhout D, Ophoff RA, van den Berg LH. A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K17I ANG mutation. *Neurology* 2009;72(3):287-8.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323(5918):1208-11.
- Vrabec K, Koritnik B, Leonardis L, Dolenc-Grošelj L, Zidar J, Smith B, Vance C, Shaw C, Rogelj B, Glavač D, Ravnik-Glavač M. Genetic analysis of

- amyotrophic lateral sclerosis in the Slovenian population. *Neurobiol Aging* 2015;36(3):1601.e17-20.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1999;73(6):2460-8.
  - Walhout R, Westeneng HJ, Verstraete E, Hendrikse J, Veldink JH, van den Heuvel MP, van den Berg LH. Cortical thickness in ALS: towards a marker for upper motor neuron involvement. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:288-294.
  - Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci Lett.* 2010;469(1):112-6.
  - Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis.* 2001;8(6):933-41.
  - Wechsler D. Wechsler Memory Scale-Revised. Manual. San Antonio: The Psychological Corporation 1987.
  - Wheaton MW, Salamone AR, Mosnik DM, McDonald RO, Appel SH, Schmolck HI, Ringholz GM, Schulz PE. Cognitive impairment in familial ALS. *Neurology* 2007;69(14):1411-7.
  - Wicks P, Abrahams S, Papps B, Al-Chalabi A, Shaw CE, Leigh PN, Goldstein LH. SOD1 and cognitive dysfunction in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2009;256(2):234-41.
  - Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem.* 2002;80(4):616-25.
  - Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:3.
  - Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, Willey E, Among MA, Ellis CM, Shaw CE, Al-Chalabi A, Leigh PN.

Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009;72(12):1087-94.

- Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*. 1999;2(1):50-6.
- Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003;29(6):529-45.
- Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell*. 1993 ;73(1):23-33.
- Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63(4):538-42.

## BIOGRAFIJA

Dr Ivan Marjanović rođen je 1979. godine u Čupriji. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je školske 1998/99. godine, a diplomirao 2004. godine sa prosečnom ocenom 9.83. Na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije bio je zaposlen je od 2006. do 2017. godine. Završni akademski specijalistički rad “Heterogenost stečene autoimune mijastenije gravis” odbranio je 2009. godine (mentor prof. dr Dragana Lavrnić). Bio je saradnik na projektu osnovnih istraživanja pod rukovodstvom akademika Vladimira S. Kostića 2006. godine Ministarstva za nauku i životnu sredinu Republike Srbije. Posebna interesovanja dr Marjanović pokazuje prema bolestima perifernog nervnog sistema, neuroimunološkim poremećajim i neurofiziologiji (elektromioneurografija), kao i prema novoj dijagnostičkoj metodi u bolestima perifernog nervnog sistema – ultrazvuku perifernih nerava i mišića. Specijalista je neurologije od 2012. godine. U zvanju kliničkog asistenta na Medicinskom fakulteta Univerziteta u Beogradu radio je od 2014. do 2017. godine. Tokom specijalizacije i nakon položenog specijalističkog ispita u više navrata boravio je na prestižnim evropskim klinikama radi dodatnog usavršavanja iz različitih oblasti neurologije (elektromioneurografija, ultrazvučna dijagnostika u bolestima perifernih nerava, biopsija kože kao dijagnostički pristup kod neuropatije tankih vlakana). Autor je i koautor više od 70 publikacija, od kojih 15 citiranih na Current Contents listi.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisani Ivan V. Marjanović

broj upisa NE-01/09

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom : „**Kliničko genetska analiza pacijenata sa familijarnom amiotrofičkom lateralnom sklerozom u populaciji Srbije**“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 24.04.2018

**Potpis doktoranda**



Ivan V. Marjanović

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ivan V.Marjanović

Broj upisa NE-01/09

Studijski program neurologija

Naslov rada: **“Kliničko genetska analiza pacijenata sa familijarnom amiotrofičkom lateralnom sklerozom u populaciji Srbije”**

Mentor Prof.dr Zorica Stević

Potpisani Ivan V.Marjanović

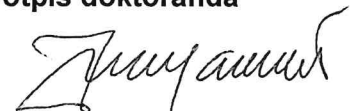
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 24.04.2018.

Potpis doktoranda



Ivan V.Marjanović

**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Kliničko genetska analiza pacijenata sa familijarnom amiotrofičkom lateralnom sklerozom u populaciji Srbije“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
- 5. Autorstvo – bez prerade**
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 24.04.2018.

**Potpis doktoranda**



Ivan V. Marjanović