

# Spinalna mišićna atrofija: napreci i izazovi u liječenju

---

Mamić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:310321>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivan Mamić**

**Spinalna mišićna atrofija – napreci i izazovi u  
liječenju**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

*Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija, Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.*

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Lidiji Bach-Rojecky na pruženoj pomoći, uloženom trudu, stručnom vodstvu, suradljivosti i strpljenu prilikom pisanja ovog rada.*

*Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori i vjeri tijekom studiranja.*

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Epidemiologija .....	1
1.2. Patologija .....	1
1.2.1. Genetika .....	1
1.2.2. Struktura i organizacija SMN proteina .....	3
1.2.3. Patogeneza .....	5
1.3. Klasifikacija i klinička slika .....	8
1.3.1. SMA tip 0 .....	10
1.3.2. SMA tip I .....	11
1.3.3. SMA tip II .....	12
1.3.4. SMA tip III .....	13
1.3.5. SMA tip IV .....	13
1.4. Dijagnostika .....	14
1.4.1. Diferencijalna dijagnoza .....	15
1.4.2. Genetička analiza .....	17
2. Obrazloženje teme .....	19
3. Materijali i metode .....	20
4. Rezultati i rasprava .....	21
4.1. Komplikacije SMA .....	21
4.1.1. Respiratorne komplikacije .....	21
4.1.2. Mišićnokoštane komplikacije .....	23
4.1.3. Gastrointestinalne i nutritivne komplikacije .....	24
4.2. Terapija .....	26
4.2.1. SMN-usmjereni terapeutici .....	26
4.2.2. SMN-neovisna terapija .....	34
4.2.3. Sadašnjost i budućnost SMA terapije .....	35
5. Zaključci .....	39
6. Literatura .....	40
7. Sažetak / Summary .....	47
8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card	

# 1.Uvod

## 1.1. Epidemiologija

Spinalna mišićna atrofija (SMA) vodeći je nasljedni uzrok smrti novorođenčadi i drugi najčešći autosomno-recesivni poremećaj u svijetu (Donlin-Asp i sur., 2016). Procijenjena incidencija SMA iznosi od 1/6000 do 1/11000 živih poroda (Ogino i sur., 2002; Ogino i sur., 2004; Flynn i sur., 2011). Panetnička prevalencija procijenjena je na 1 na 11,000 (Flynn i sur., 2011). Incidencije se pojedinih tipova značajno razlikuju; prema meta-analizi Ogino i sur. iz 2004. godine incidencija SMA tipa I je najveća i iznosi 5,83 na 100 000 živih poroda, za SMA tipa II incidencija je 2,66 na 100 000 te za tip III, 1,20 na 100 000 živih poroda (Ogino i sur., 2004). Slični su rezultati dobiveni sustavnim pregledom 116 radova iz 2017. godine. Izračunate su incidencije iznosile 5,5, 1,9 te 1,7 na 100 000 živih poroda za tip 1, 2, odnosno 3 (Verhaart i sur., 2017). Unatoč najvećoj incidenciji SMA tipa 1, njezina je prevalencija u općoj populaciji procijenjena na svega 0,04 do 0,28 na 100 000, što se objašnjava kratkim očekivanim životnim vijekom osoba oboljelih od ovog tipa razorne bolesti. Ukupna prevalencija tipa 2 i 3 iznosi 1,5 na 100 000 (Verhaart i sur., 2017).

Dobivanje kvalitetnijih epidemioloških podataka veliki je izazov zbog relativno malog broja recentnih studija, malih uzoraka i krvne srodnosti pacijenata koji su sudjelovali u studijama ograničenim na mala zemljopisna područja, varijabilnosti dijagnostičkih kriterija, klasifikacije SMA itd. (Verhaart i sur., 2017).

## 1.2. Patologija

### 1.2.1. Genetika

SMA je autosomno–recesivna bolest uzrokovana gubitkom ili mutacijom gena za preživljenje motoričkog neurona 1 (eng. *Survival of Motor Neuron 1, SMN1*) te zadržavanjem gena za preživljenje motoričkog neurona 2 (eng. *Survival of Motor Neuron 2; SMN2*) (Lefebvre i sur., 1995). Oba su gena smještena na istom lokusu kromosoma 5q13, unutar regije karakterizirane

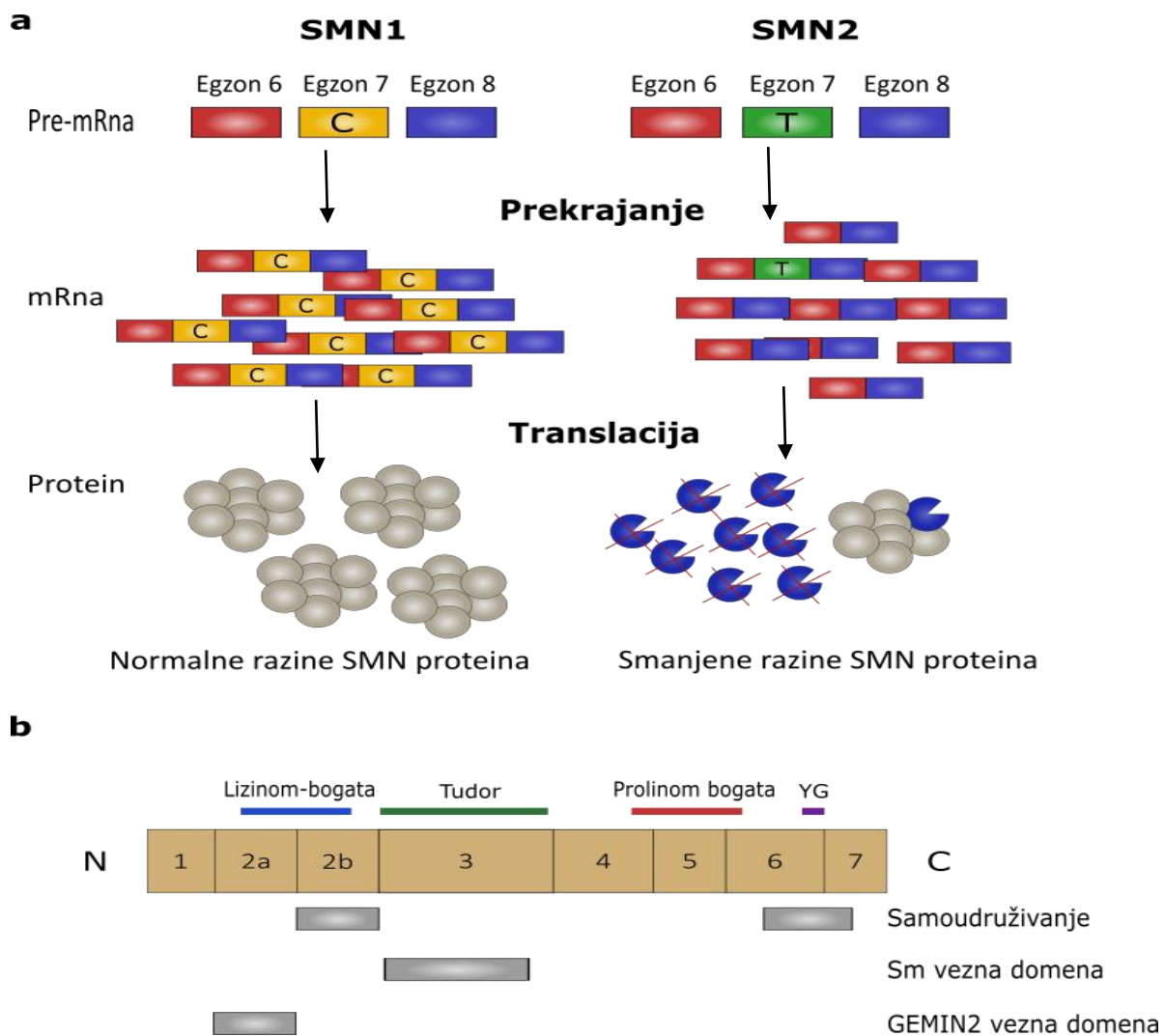
malim brojem ponavljajućih elemenata (Brzustowicz *i sur.*, 1990; Lien *i sur.*, 1991; Clermont *i sur.*, 1994; Lefebvre *i sur.*, 1995). SMN2 gen nastao je duplikacijom *SMN1* gena (Lefebvre *i sur.*, 1995) uz zadržavanje vrlo visokog stupnja homologije, koja je dotad viđena samo kod pseudogena (Monani *i sur.*, 1999). Prisutan je samo u ljudi dok ostale vrste imaju samo jedan *SMN* gen, što prirodne mutacije u životinja čini malo vjerojatnim jer su embrionalno letalne (Duque *i sur.*, 2015).

Oba gena kodiraju isti protein, SMN (eng. *Survival of Motor Neuron*), pri čemu *SMN2* stvara manje količine genskog produkta. Prema tome, SMA nije uzrokovana potpunim nedostatkom, već smanjenim razinama SMN proteina (Lefebvre *i sur.*, 1995). Identificirano je nekoliko razlika u nukleotidnom slijedu između *SMN* gena (Lefebvre *i sur.*, 1995; Lorson *i sur.*, 1999), ali kritična je zamjena C–T unutar egzona 7 (Lefebvre *i sur.*, 1995). Iako se radi o sinonimnoj mutaciji, ona dovodi do alternativnog prekrajanja pre-mRNA i smanjene inkorporacije egzona 7 u zrele mRNA (Lorson *i sur.*, 1999; Monani *i sur.*, 1999). Preciznije, zamjena C–T na položaju Ex7+6 narušava funkciju egzonskog pojačivača prekrajanja (eng. *exonic splicing enhancer*), koji pomaže normalno prekrajanje potrebno za stvaranje intaktnog SMN proteina (Cartegni i Krainer, 2002). Nedostatak aminokiselinskog slijeda kodiranog egzonom 7 ometa sposobnost oligomerizacije i dovodi do brze razgradnje SMN proteina. (Slika 1.a) (Lorson, 1998; Burnett *i sur.*, 2009). Otprilike 10 % SMN2 pre-mRNA se ispravno prekraja i prevodi u funkcionalni protein (Lefebvre *i sur.*, 1995). Međutim, učinkovitost prekrajanja SMN2 može ovisiti o težini bolesti i stvaranje cjelovitog SMN2 transkripta može iznositi od 10 % do 50 %. Tako niske razine SMN proteina omogućavaju embrionalni razvoj, ali nisu dovoljne za očuvanje motoričkih neurona kralježničke moždine (Lunn i Wang, 2008).

U 95 % slučajeva SMA je uzrokovana homozigotnim delecijama *SMN1* gena, međutim, u 5 % slučajeva javljaju se male mutacije poput: malih delecija, mutacija na mjestu prekrajanja i nesmislenih mutacija (Burghes i Beattie, 2009). Gubitak *SMN2*, uz zadržavanje *SMN1* gena je moguć, ali ne rezultira bolesnim fenotipom, što *SMN1* čini genom koji određuje bolest (Burghes, 1997).

## 1.2.2. Struktura i organizacija SMN proteina

SMN protein eksprimiran je u jezgri i citoplazmi svih stanica (Burghes i Beattie, 2009; Nash *i sur.*, 2016; Singh *i sur.*, 2017). Cjeloviti protein ima molekulsku masu 38 kD i sastoji se od 294 aminokiselinskih ostataka podijeljenih u nekoliko domena, uključujući N-terminalne, GEMIN2 (eng. gem-associated protein 2) i domenu koja veže nukleinske kiseline, središnju Tudor domenu, te C-terminalne, prolinom bogatu i YG domenu. Mutacije u svim domenama povezane su sa SMA, što sugerira kako je cjelovita struktura proteina presudna za njegovu funkciju (Singh *i sur.*, 2017). Usporedba aminokiselinske sekvence između nekoliko vrsta pokazuje visok stupanj konzerviranosti ovog proteina u viših kralježaka. Tri niza od pedesetak konzerviranih aminokiselinskih ostataka smješteno je na N-terminusu, središnjoj regiji te C-terminusu. Sve spomenute regije proteina imaju partnere s kojima stupaju u interakciju. Domena koja veže nukleinske kiseline konzervirana je i preklapa se s veznim mjestom proteina GEMIN2. Smatra se kako upravo kompleks SMN-GEMIN2 igra ključnu ulogu u: funkciji proteina, uključujući sastavljanje malih nuklearnih ribonukleoproteina (eng. *small nuclear ribonucleoproteins*, snRNP), DNA rekombinaciji, sintezi čestice za prepoznavanje signala (eng. *signal recognition particle*, SRP) i regulaciji translacije. Nadalje, domena kodirana egzonom 2 stvara interakcije s proteinom p53, koji djeluje kao supresor tumora te igra važnu ulogu u staničnom ciklusu. Nizvodno se nalazi Tudor domena iza koje slijedi prolinom bogata domena, koja stupa u interakciju s profilinima, proteinima odgovornima za kontrolu dinamike aktina u stanicama. YG domena, zajedno s posljednjih 16 aminokiselina egzona 7 potiče samoudruživanje koje je kritično za stabilnost i subcelularnu lokalizaciju proteina (Singh *i sur.*, 2017). Važno je spomenuti kako protein nastao translacijom SMN $\Delta$ 7 transkripta nema sposobnost oligomerizacije (Lorson, 1998; Lorson *i sur.*, 1999; Burnett *i sur.*, 2009) (Slika 1.b).



Slika 1. Struktura SMN gena i proteina (preuzeto i prilagođeno iz Burghes i Beattie, 2009)

**a** | SMN1 i SMN2 geni imaju identičnu strukturu i 99,9 % su identični na razini nukleotidne sekvence. Ključna razlika između dva gena je u zamjeni jednog nukleotida u egzonu 7 (C ili T, kako je i naznačeno). Ta razlika utječe na prekrajanje gena, tako da većina SMN2 transkripata nema, dok većina SMN1 transkripata sadrži egzon 7. Međutim, zbog toga što SMN2 ipak proizvodi malu količinu cjelovitog SMN proteina, može se smatrati genom koji ima smanjenu funkciju, a ne njezin potpuni gubitak. Gubitak aminokiselina kodiranih egzonom 7 rezultira stvaranjem SMN proteina sa značajno smanjenom učinkovitosti oligomerizacije i stabilnosti. Na taj način, gubitak SMN1 gena uzrokuje smanjene razine SMN proteina u većini tkiva. SMN oligomer predstavljen je kao oktamer. **b** | Dijagram SMN pokazuje egzone i domene. Egzon 2b kodira domenu koja je važna za vezanje GEMIN2, kao i za samoudruživanje. Oba egzona 2a i 2b su konzervirana. Tudor domena veže Sm proteine i dijeli homologiju s drugim Tudor domenama. Egzon 5 i dio egzona 6 sadrže prolinom bogate domene koje možda utječu na vezanje profilina. C-terminalna domena egzona 6 sadrži konzerviranu YG kutiju koja je važna za samoudruživanje.



### 1.2.3. Patogeneza

SMA je neurodegenerativna bolest karakterizirana progresivnom denervacijom skeletnih mišića, mišićnom slabosti, paralizom te konačno smrću zbog respiratornog zastoja. SMA je opisana kao razvojna sinaptopatija neuromuskularnih spojnica praćena patološkim promjenama motoričkih neurona. Unatoč tome što SMA-specifična oštećenja prvenstveno pogađaju motoričke neurone, sve je veći broj dokaza o uključenosti ostalih tkiva i tipova stanica u teškim oblicima bolesti. Propadanje aksona prethodi odumiranju motoričkih neurona, a defekti neuromuskularnih spojnica najraniji su otkriveni događaji u animalnim modelima bolesti. Neuromuskularne spojnice uspostavljaju se uobičajenom brzinom, ali uz strukturalne i funkcionalne perturbacije i defekte sazrijevanja na morfološkoj i molekularnoj razini. Razlog specifične osjetljivosti motoričkih neurona i neuromuskularnih spojnica u SMA velikim je dijelom nepoznat (Donlin-Asp i sur., 2016).

U ljudi, ekspresija SMN proteina započinje u embrijima oko petog tjedna gestacije. Visoke su razine proteina pronađene u skeletnim mišićima, kralježničkoj moždini, slezeni, srcu, bubrezima, jetrima i plućima. Obrazac ekspresije SMN proteina sličan je kroz sve stadije embrionalnog razvoja. Međutim, unatoč sličnoj razini ekspresije, najveća je aktivnost SMN proteina zabilježena u mozgu i kralježničkoj moždini. U štakora, SMN ekspresija u svim tkivima osim mozga i kralježničke moždine, značajno se smanjuje nakon embriogeneze. To bi moglo upućivati na velike potrebe za SMN proteinom u većini tkiva tijekom, te na smanjene potrebe nakon embriogeneze. Nadalje, analiza *SMN2* gena sugerira veći doprinos tog gena cjelovitom SMN proteinu u mišićnom tkivu i bubregu u odnosu na kralježničku moždinu. Prema tome, moguće je kako *SMN2* učinkovito prevenira razvoj bolesnog fenotipa u perifernim tkivima, ali ne i u  $\alpha$ -motoričkim neuronima, što bi barem djelomično objasnilo spacijalnu ograničenost SMA (Nash i sur., 2016).

Predložene su brojne funkcije SMN proteina, međutim, mali broj istih je i potvrđen. Danas je poznato, gotovo sigurno, kako SMN protein ima esencijalnu funkciju u brojnim staničnim procesima, a brojnost tih funkcija ukorijenjena je u raznolikosti partnera s kojima SMN stupa u interakciju (Singh i sur., 2017). Najbolje okarakterizirana uloga SMN proteina je uključenost u slaganje malih nuklearnih ribonukleoproteina (eng. *small nuclear ribonucleoproteins, snRNP*), kompleksa sastavljenih od male nuklearne RNA (eng. *small nuclear RNA, snRNA*) i Sm proteina koji tvore tjelešca za prekrajanje (eng. *spliceosome*).

Delecija SMN proteina iz stanice rezultira smanjenim sastavljanjem snRNP-ova te postoji korelacija između sastavljanja snRNP-ova i težine bolesti u mišjim modelima (Nash *i sur.*, 2016).

Većina funkcija SMN proteina smatra se da je vezana uz RNA metabolizam. Osim već navedene, postoje dokazi o uključenosti SMN proteina u transkripciju RNA, sastavljanje malih nukleolarnih ribonukleoproteina (eng. *small nucleolar ribonucleoprotein, snoRNP*), regulaciju aktivnosti telomeraze, translaciju, biogenezu čestica za prepoznavanje signala (eng. *signal recognition particle, SRP*), prometovanje mRNA itd. Izuzev funkcija vezanih uz RNA, određeni dokazi podupiru ulogu SMN kompleksa u rekombinaciji i popravku DNA, prijenosu signala, endocitozi i autofagiji (Singh *i sur.*, 2017).

U konačnici, od otkrića kako mutacija *SMN1* gena uzrokuje SMA (Lefebvre *i sur.*, 1995), napravljen je ogroman napredak u razumijevanju funkcija SMN proteina. Kao što je već spomenuto, SMN je esencijalni protein u brojnim procesima koji se odvijaju i u citosolu i u jezgri stanica. Većina funkcija zahtjeva interakcije s drugim proteinima i formiranje kompleksa, međutim točna uloga SMN proteina u tim kompleksima još uvijek nije poznata (Singh *i sur.*, 2017). Detaljnija analiza funkcije SMN proteina je izvan opsega ovog rada.

Unatoč rastućim saznanjima o funkcijama SMN proteina, još uvijek nije jasno kako njegove smanjene razine uzrokuju SMA. S tim u vezi, predložene su dvije hipoteze (Slika 2). Prva sugerira kako poremećeno slaganje snRNP-ova utječe na prekrajanje odabrane skupine gena važnih za funkciju motoričkih neurona. Druga predlaže kako SMN ima funkciju u aksonima koja je ometena u SMA. Moguće je kako su hipoteze povezane (Burghes i Beattie, 2009).

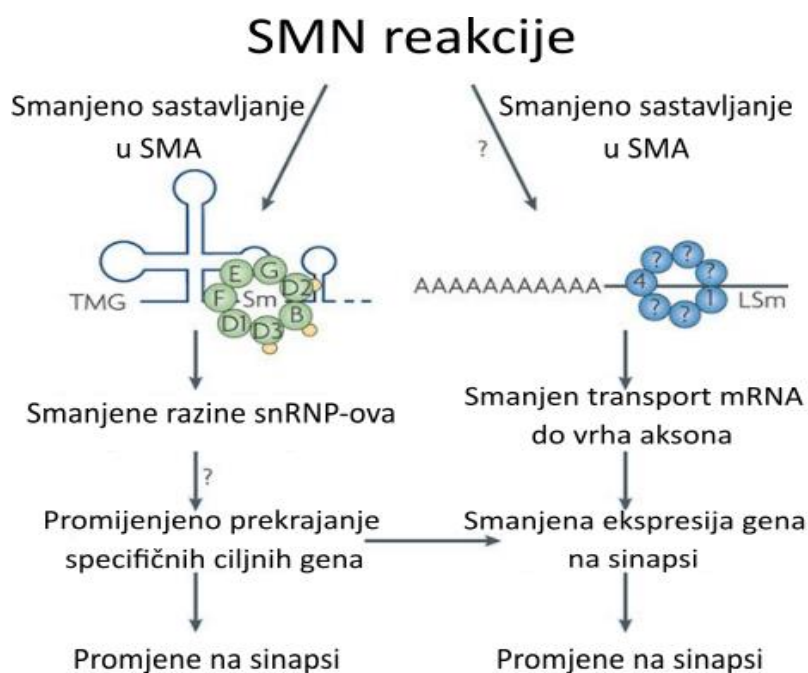
Prema prvoj hipotezi redukcija SMN-a utječe na sastavljanje snRNP-ova, mijenja njihovu količinu i/ili profil te uzrokuje promjene u prekrajanju. Istraživanja na animalnim modelima pokazala su korelaciju između sposobnosti SMN kompleksa u slaganju snRNP-ova i sposobnosti preživljavanja SMA životinja. U zebricama (lat. *Danio rerio*), smanjene razine SMN-a uzrokuju defekte aksona motoričkih neurona koji se mogu popraviti uvođenjem sastavljenih snRNP-ova, sugerirajući pri tome kako je sastavljanje snRNP-ova ključan put koji pogađa motoričke aksone kada su razine SMN proteina niske. Nadalje, uvođenje snRNP-ova ispravilo je i morfološke defekte poput skraćene i/ili iskrivljene osi tijela te odgođenog razvoja. Osim toga, utišavanje (eng. *knock-down*) *GEMIN2* gena, koji kodira vrlo važnog, istoimenog partnera SMN proteina (Singh *i sur.*, 2017), dovodi do sličnih poremećaja motoričkih neurona, podupirući teoriju o važnosti ispravnog sastavljanja snRNP-ova.

Konačno, poremećaji aksona u zebricama s utišanim *SMN* genom, mogu se popraviti uvođenjem cjelovite ljudske *SMN* mRNA, ali ne i *SMN $\Delta$ 7* mRNA (Burghes i Beattie, 2009).

Velik problem u razumijevanju patogeneze SMA predstavlja činjenica kako nije moguće razlikovati promjene koje se javljaju zbog smanjenih razina *SMN* proteina nasuprot sekundarnim promjenama zbog tijeka bolesti. Odnosno, teško je razlikovati promjene u prekrajanju ili ekspresiji koje se javljaju kao posljedica stresa u odnosu na one koje su posljedica deplecije *SMN* proteina. Iako je u SMA poremećeno prekrajanje velikog broja gena, nije moguće zaključiti kako se radi o pan-prekrajajućoj bolesti, prije nego li o poremećaju koji utječe na specifične mete važne za motoričke neurone (Burghes i Beattie, 2009).

Druga hipoteza ističe funkciju *SMN*-a u aksonima koja nije izravno vezana uz sposobnost slaganja snRNP-ova. *SMN* je pronađen u aksonima kulture neurona kao dio kompleksa koji ne sadrže Sm proteine. Međutim, *SMN* nije jednoznačno dokazan u aksonima ili sinapsama kralježaka *in vivo*. Ideja o ulozi *SMN*-a u aksonima ojačana je činjenicom da „knockdown“ zebrice razvijaju specifična oštećenja aksona motoričkih neurona, uključujući okrnjene i/ili razgranate aksone. Je li to posljedica gubitka sposobnosti slaganja snRNP-ova ili neke druge funkcije *SMN* proteina, nije poznato, ali trenutno, niti jedan mutantni oblik *SMN*-a koji nema sposobnost slaganja snRNP-ova, ne može ispraviti SMA u životinja ili ljudi (Burghes i Beattie, 2009). Kao što je već spomenuto, postoji potpuna korelacija između smanjene sposobnosti slaganja snRNP-ova i težine bolesti. Međutim, moguće je kako smanjeno slaganje drugih RNP kompleksa, primjerice LSm (Like Sm) proteina na mRNA, korelira s težinom oboljenja, ali ta mogućnost nije dovoljno istražena (Burghes i Beattie, 2009).

Specifična oštećenja, uočena u animalnim modelima bolesti, dovode do promjene u distribuciji  $\text{Ca}_v2.2$  kanala za  $\text{Ca}^{2+}$  na membrani presinaptičkih završetaka i odgovarajućih elektrofizioloških posljedica. Promjena distribucije  $\text{Ca}^{2+}$  kanala na neuromuskularnim spojnica mogla bi utjecati na otpuštanje neurotransmitora i razvoj aktivnih zona. Međutim, nije jasno zašto se takve promjene ne vide u sinapsama središnjeg živčanog sustava kada je za njihovu funkciju  $\text{Ca}_v2.2$  kanal također bitan. Osim promjene u distribuciji  $\text{Ca}^{2+}$  kanala, u animalnim je modelima uočen i skraćen rast aksona, s malim konusima rasta i smanjenim transportom  $\beta$ -aktinske mRNA. Suština hipoteze je kako smanjene razine *SMN*-a utječu na slaganje LSm proteina potrebnih za aksonalni transport mRNA, što dovodi do smanjene ekspresije specifičnih gena u sinapsama. Konačni dokazi da je aksonalni *SMN* kompleks kritično poremećen u SMA nedostaju (Burghes i Beattie, 2009).



Slika 2. Mehanizmi nastanka SMA (preuzeto i prilagođeno iz Burghes i Beattie, 2009)

**Prema prvoj hipotezi** (lijeva strana) niske razine SMN proteina rezultiraju smanjenim sastavljanjem Sm proteina na snRNA. To nejednako promjeni razine specifičnih endogenih snRNP-ova, poput onih potrebnih za izrezivanje malih introna iz pre-mRNA. Ostaje utvrditi koji su nizvodni ciljni geni pogođeni i kako to specifično utječe na motoričke neurone (naznačeno s „?“). **Druga hipoteza:** smanjene razine SMN proteina utječu na sastavljanje Lsm proteina potrebnih za akosnalni transport mRNA, dovodeći do smanjene ekspresije specifičnih gena u sinapsi. Međutim, funkcionalna biokemijska ispitivanja koja povezuju smanjene razine SMN proteina i promjene u formaciji kompleksa potrebnih za transport mRNA nedostaju (naznačeno s „?“). Moguće je kako su dvije hipoteze povezane na način da smanjeno slaganje snRNP-ova reducira prekrajanje ciljnog gena koji je ključan u prijenosu mRNA do sinapse motoričkih neurona. TMG: trimetilgvanozin kapa.

### 1.3. Klasifikacija i klinička slika

Spinalna mišićna atrofija heterogena je skupina poremećaja koju čini kontinuum, radije nego li diskretni fenotipovi, a proteže se od vrlo teškog oblika s nastupom simptoma *in utero* do vrlo blagog oblika s nastupom simptoma u odrasloj dobi (Dubowitz, 1995; Zerres i Davies, 1999). Svi tipovi SMA karakterizirani su degeneracijom stanica prednjeg roga kralježničke moždine koja rezultira progresivnom mišićnom slabosti i atrofijom (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Kognicija je normalna (von Gontard *i sur.*, 2002). Težina bolesti uglavnom

obrnuto korelira s brojem kopija *SMN2* gena, koji varira u normalnoj populaciji, a u manjoj mjeri s razinom SMN proteina (Lefebvre *i sur.*, 1997; Kolb i Kissel, 2015).

Današnja klasifikacija SMA prvi je put postavljena 1991. godine na Međunarodnom konzorciju o SMA te je dogovorena podjela u tri skupine na temelju dobi u kojoj nastupaju simptomi i postignutih ključnih točaka motoričkog razvoja. U svrhu kliničke klasifikacije, zadržan je pristup maksimalnog ostvarenog funkcionalnog statusa, koji određuje tip I kao *non-sitters*, tip II kao *sitters* i tip III kao *walkers* (Darras, 2015). Prvotna je klasifikacija kasnije proširena podjelom SMA tipa III na IIIa i IIIb, ovisno o tome je li nastup simptoma prije, odnosno nakon treće godine života, zbog bolje prognoze pacijenata koji boluju od potonjeg oblika (Zerres *i sur.*, 1997). Uveden je tip IV SMA kao vrlo blagi oblik, te tip 0 za pacijente s prenatalnim nastupom i smrću unutar nekoliko mjeseci (Kolb i Kissel, 2015) (Tablica 1).

Djeca oboljela od SMA tipa I imaju nastup simptoma u razdoblju između rođenja i šest mjeseci starosti, a većina premine ili postane ovisna o mehaničkoj ventilaciji do druge godine života. Tip II se prezentira između 6 i 18 mjeseci starosti, a oboljeli steknu sposobnost samostalnog sjedenja. Nastup simptoma kod tipa III je nakon 18 mjeseci života, životni vijek je gotovo normalan, a oboljeli samostalno sjede, stoje te hodaju. Tip IV je najblaži oblik, simptomi se javljaju u zreloj dobi, životni vijek je normalan (Darras, 2015).

Važno je napomenuti kako su navedeni klinički tipovi definirani u neliječenih pacijenata. Međutim, primjenom naprednih terapijskih intervencija, dolazi do fenotipskih promjena i promjena u progresiji bolesti (Finkel *i sur.*, 2017; Mendell *i sur.*, 2017; Tizzano i Finkel, 2017; Mercuri *i sur.*, 2018a). Učinak je vrlo ovisan o vremenu započinjanja terapije, pri čemu je ranija intervencija učinkovitija. Kasnije liječenje, međutim, također daje rezultate, uzimajući u obzir povećano preživljenje i očuvanje funkcije (Gidaro i Servais, 2018).

Suvremena klasifikacija ima određena ograničenja. Prije svega, unutar pojedinih tipova bolesti postoji značajna varijabilnost fenotipova. Nadalje, klasifikacija određenog dijela oboljelih nije moguća. Očekivani je životni vijek često bolji od predviđenog (osobito u težim oblicima bolesti), a konačno određenje pacijenta u pojedini tip SMA moguće je napraviti tek u kasnijim stadijima bolesti (Zerres i Rudnik-Schoneborn, 1995). Međutim, i u genetičkoj eri ovo je ostao relevantan način klasifikacije SMA koji ipak pruža korisne kliničke i prognostičke informacije (Kolb i Kissel, 2015).

Tablica 1. Klinička klasifikacija spinalne mišićne atrofije (preuzeto i prilagođeno iz Darras, 2015)

Tip SMA	Drugi nazivi	Dob nastupa	Životni vijek	Maksimalna ostvarena funkcija	Ostale karakteristike	Incidencija (%)
Tip 0	Prenatalna, kongenitalna SMA	Prenatalno, <i>in utero</i>	< 6 mjeseci	Uglavnom ne dostignu motoričke prekretnice	Teška slabost pri porođaju Izražena hipotonija Facijalna diplegija Arefleksija Rani respiratorni zastoj Kontrakture zglobova	
Tip I	Werdning-Hoffmannova bolest, Teška SMA ( <i>nonsitters</i> )	< 6 mjeseci	< 2 godine bez respiratorne potpore	Ne mogu sjediti samostalno	Slabost Hipotonija Fascikulacije jezika Hiporefleksija, arefleksija Poteškoće sisanja i gutanja Respiratorni zastoj	60
Tip II	Umjeren SMA ( <i>sitters</i> )	6-18 mjeseci	> 2 godine, 70% doživi 25 godina starosti	Sjede samostalno, gotovo nikada ne stoje, nikada ne hodaju samostalno	Proksimalna slabost Posturalni tremor ruku Hiporefleksija Prosječne ili iznadprosječne intelektualne sposobnosti Skolioza	27
Tip III	Kugelberg-Welanderova bolest, blaga SMA ( <i>walkers</i> )	> 18 mjeseci starosti Tip IIIa < 3 godine starosti Tip IIIb > 3 godine starosti	Gotovo normalan	Sjede i hodaju samostalno	Moguć tremor ruku Podsjećá na muskularnu distrofiju	12
Tip IV	Adultna SMA	> 21 godine starosti	Normalan	Normalna		1

### 1.3.1. SMA tip 0

SMA tip 0 ili vrlo teška SMA ima prenatalni nastup karakteriziran smanjenim fetalnim pokretima u zadnjem tromjesečju. Klasična prezentacija pri rođenju uključuje izostanak respiratornog napora te potrebu za ventilacijom, a u određenim slučajevima i oživljavanje. Gotovo univerzalno je prisutna generalizirana slabost, hipotonija, arefleksija i izostanak spontanih pokreta ili njihova ograničenost na dlanove i stopala. Fascikulacije su jezika gotovo uvijek prisutne, kao i otežano gutanje, što u težim slučajevima zahtjeva hranjenje putem

nazogastrične sonde. „Bell-shaped chest“, slab plač, edemi lica, nogu i ruku su također česti znakovi. Vrlo teški slučajevi SMA tipa 0 rezultiraju smrću *in utero*. Autopsija i biopsija ukazuje na gubitak mijeliniziranih vlakana i oštećenje aksona u senzoričkim i miješanim vlaknima. Sva djeca ostaju ovisna o ventilaciji do smrti koja nastupa unutar šest mjeseci, najčešće kao posljedica respiratorne dekompenzacije zbog infekcije ili aspiracije. Nakon isključivanja aparata smrt nastupa unutar nekoliko sati (Thomas i Dubowitz, 1994; Macleod *i sur.*, 1999).

Djeca oboljela od SMA tipa 0 uglavnom imaju jednu kopiju *SMN2* gena (Kolb i Kissel, 2015).

### 1.3.2. SMA tip I

Prije više od 100 godina, Giudo Werding i Johan Hoffmann prvi su opisali infantilnu SMA kao poremećaj progresivne slabosti koji započinje u dječjoj dobi i rezultira ranim nastupom smrti (Russman, 2007). Daljnje opise dali su Sylvestre 1899., Beevor 1902. te Byers i Banker 1961. godine (Russman, 2007; Dubowitz, 2009; Darras, 2015).

Djeca koja boluju od SMA tipa I, poznate i kao Werding-Hoffmannova bolest, postaju simptomatska u razdoblju između rođenja i šest mjeseci starosti (Thomas i Dubowitz, 1994; Zerres i Rudnik-Schoneborn, 1995; Dubowitz, 1999; Russman, 2007). Karakteristični znakovi su opća hipotonija, zbog koje u ležećem položaju noge oboljelih poprimaju žablji položaj, slabost udova i aksijalne muskulature te arefleksija. Slabost više zahvaća noge nego ruke, a spontani su pokreti uglavnom ograničeni na stopala, podlaktice i dlanove. Mišići lica uglavnom nisu zahvaćeni, ali se slabost može javiti u kasnijim fazama bolesti. Oboljeli nikada ne mogu samostalno sjediti (*non sitters*). Interkostalni su mišići gotovo uvijek zahvaćeni, pri čemu je dijafragma relativno pošteđena. Prsa imaju zvonast oblik (eng. bell-shaped chest) te je prisutno paradoksalno disanje. Prisutne su fascikulacije jezika, poteškoće gutanja i sisanja (Thomas i Dubowitz, 1994; Zerres i Davies, 1999; Darras, 2015). Respiratorni zastoj obično nastupa prije druge godine života.

U prošlosti većina djece nije doživjela više od dvije godine starosti, međutim razvojem potpomognute ventilacije kao i cjelokupne njege, stopa preživljenja nešto je porasla. Prema starijim studijama 68 % djece preminulo bi do druge godine života, a 82 % do četvrte. Primjenom nutritivnih i respiratornih intervencija smrtnost je smanjena na 30 % unutar dvije

godine života, ali polovica preživjelih potpuno je ovisna o neinvazivnoj ventilaciji (Darras, 2015).

Osobe oboljele od SMA tipa I najčešće imaju 2 ili 3 kopije *SMN2* gena (Kolb i Kissel, 2015).

### 1.3.3. SMA tip II

Umjereni oblik SMA prvi je put prijavljen 1893. godine na Sveučilištu u Edinburghu, ponovno opisan 1961. godine od strane Byersa i Bankera te u detalje od strane Dubowitza 1964. godine, prema kojem je bolest i dobila ime, Dubowitzeva bolest (Darras, 2015).

Nastup simptoma je između 6. i 18. mjeseca života, međutim, može biti i ranije. Oboljeli mogu samostalno sjediti (*sitters*), ali nikada stajati ili hodati (Zerres i Rudnik-Schoneborn, 1995; Russman, 2007; Darras, 2015). Imaju proksimalnu progresivnu slabost koja više zahvaća noge nego ruke, hipotoniju i arefleksiju. Dio djece ima poteškoće sjedenja i rotacije u ležećem položaju. Tijekom života razviju skoliozu, koja starenjem, zajedno sa slabošću interkostalnih mišića dovodi do razvoja restriktivne bolesti pluća. Osobe razviju kontrakture zglobova te mogu imati ankilozu mandibule (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Indeks tjelesne mase može biti manji nego kod zdrave djece, međutim visoko funkcionalne, nepokretne osobe, pod rizikom su od razvoja pretilosti (Darras, 2015).

Stupanj preživljenja kod ovog oblika bolesti iznosi približno 97,8 % do 10. godine života, odnosno 68,5 % do 25. godine (Zerres *i sur.*, 1997). Uglavnom imaju 3 kopije *SMN2* gena (Kolb i Kissel, 2015).



#### 1.3.4. SMA tip III

Blagi oblik SMA, poznat također kao Kugelberg-Welanderova bolest, ima širok raspon kliničkog nastupa. Prvi se simptomi uglavnom javljaju nakon 18 mjeseci starosti, a oboljeli nauče samostalno stajati i hodati (*walkers*). Ovaj oblik bolesti podijeljen je na dva podtipa; IIIa (nastup simptoma prije 3. godine života) i IIIb (nastup simptoma nakon 3. godine života), prvenstveno na temelju statistički značajne vjerojatnosti da osobe budu pokretne nakon određenog trajanja bolesti. Za tip IIIa ta vjerojatnost iznosi 22 %, a za tip IIIb 58,7 % nakon 40. godine života.

Karakteristična klinička slika uključuje progresivnu proksimalnu slabost koja zahvaća noge više nego ruke. Oboljeli uglavnom ne razviju slabost respiratornih mišića ili tešku skoliozu. Gubitak pokretnosti povećava rizik od ovih komplikacija. Mogu imati tremor. Životni vijek obično nije značajno skraćen u usporedbi sa zdravom populacijom (Zerres *i ostali*, 1997; Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015).

Prosječan broj kopija *SMN2* gena iznosi 3 ili 4 (Kolb i Kissel, 2015).

#### 1.3.5. SMA tip IV

Na blagom kraju spektra fenotipova nalaze se osobe oboljele od tipa IV SMA. Predstavljaju manje od 5 % svih SMA slučajeva i imaju najblaži oblik bolesti. Pokretni su, a nastup simptoma je najčešće nakon 21. godine života. Dostignu sve ključne točke motoričkog razvoja, te imaju normalan životni vijek (Darras, 2015; [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)).

Prosječan broj kopija *SMN2* gena iznosi 4 do 8 (Kolb i Kissel, 2015).

## 1.4. Dijagnostika

Dijagnoza SMA postavlja se uz obiteljsku povijest, kliničku sliku i genetičko testiranje (Prior i Finanger, 2016). Dijagnostički postupak nije se promijenio još od prvotnog konsenzusa postignutog 2007. godine. (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Ukoliko je obiteljska povijest negativna, dijagnostički je postupak potaknut kliničkom slikom. Hipotonija, progresivna, simetrična te proksimalna slabost, koja više zahvaća noge nego ruke, slabost interkostalnih mišića, relativno pošteđena dijafragma i paradoksalno disanje, visoko su sugestivni za SMA (za više informacija vidi poglavlje 1.3.) (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Otprilike 95 % oboljelih od SMA imat će homozigotnu deleciju *SMN1* gena (Arnold *i sur.*, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a). U suštini, svi ostali pacijenti sa *SMN* povezanom SMA, bit će heterozigoti s delecijom jednog *SMN1* gena i malom mutacijom drugog (Arnold, Kassari i Kissel, 2015). Poznat je samo jedan pacijent koji je imao homozigotnu dvostruku mutaciju *SMN1* gena (Kirwin *i sur.*, 2013). Većina oboljelih naslijedit će deleciju *SMN1* gena od svojih roditelja, a u 2 % slučajeva javljaju se *de novo* mutacije u jednom od 2 alela (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Do pojave genetičke analize, elektrodijagnostički postupci i mišićna biopsija bili su važni alati u postavljanju ispravne dijagnoze SMA. Elektrodijagnostika, uključujući elektromiografiju i ispitivanja živčane provodljivosti, danas je rezervirana za atipične slučajeve, pacijente kod kojih nije dokazana delecija odnosno mutacija *SMN1* gena te kod kroničnih oblika SMA s manje izraženim fenotipom. Mišićna biopsija nije indicirana u dijagnozi SMA jer se dokazi o prisutnosti denervacije mogu jednostavnije dobiti elektrodijagnostikom. U konačnici, zbog učestalosti SMA i učinkovitosti genetičkog testiranja, vrlo je važno izbjeći postupke koji su invazivni i nepotrebni (Arnold, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a). Razine kreatin kinaze uglavnom su normalne ili blago povišene, iako su prijavljeni slučajevi sa značajno povišenim (10x) serumskim razinama (Mercuri *i sur.*, 2018a).

### 1.4.1. Diferencijalna dijagnoza

Slabost i denervacija u ranoj dobi karakteristika su SMA, ali i brojnih drugih nasljednih poremećaja motoričkih neurona koji nisu povezani sa SMN genom (ne-5q SMA) te se prezentiraju drugačijim kliničkim simptomima (Zerres i Davies, 1999). Atipični simptomi uključuju kontrakture zglobova, distalnu prije nego proksimalnu slabost, paralizu dijafragme s ranim respiratornim zatajenjem i pontocerebelarnu degeneraciju. DNA testiranje dostupno je za neke od ovih, ali ne sve poremećaje (Wang *i sur.*, 2007).

Ukoliko klinička slika upućuje na SMA, a pretragama nisu pronađene delecije na bilo kojem kromosomu 5, klinički pregled je potrebno učiniti ponovo uz dodatne dijagnostičke postupke, zbog preklapanja dijela simptoma ne-5q SMA i prave SMA (Wang *i sur.*, 2007). U tablici 2 prikazane su bolesti koje je potrebno uzeti u obzir prilikom diferencijalne dijagnoze SMA.

Tablica 2. Poremećaji koje je potrebno razmotriti prilikom diferencijalne dijagnoze SMA (preuzeto i prilagođeno iz Prior i Finanger, 2016)

Dob nastupa	Poremećaj	Model nasljeđivanja	Klinička svojstva	
			Preklapajuća sa SMA	Razlikovna od SMA
Prenatalno do <6 mjeseci	X-vezana infantilna SMA	XL	Hipotonija, slabost, arefleksija	Multiple kongenitalne kontrakture, frakture
	SMA i respiratoni distress (SMARD1)	AR	Slabost, respiratorno zatajenje, hipo- ili arefleksija	Distalna slabost, paraliza dijafragme
	Prader-Willi sindrom		Hipotonija	Slab respiratorni napor je rijedak
	Miotonička distrofija tip I	AD	Hipotonija	Izostanak fascikulacija jezika
	Kongenitalna mišićna distrofija	AR AD	Hipotonija, slabost	CNS, očni simptomi
	Poremećaji biogeneze peroksisoma, Zellweger sindrom	AR	Hipotonija	Gubitak vještina, Hepatosplenomegalija
> 6 mjeseci	Botulizam		Proksimalna mišićna slabost	Akutni nastup, izražena paraliza kranijalnog živca
Kasno djetinstvo	Guillain-Barre sindrom		Mišićna slabost	Subaktuni nastup, uključenost senzoričkih živaca
	Duchenneova mišićna distrofija	XL	Hipotonija	Serumske koncentracije CK 10-20x > normalnih
	Deficijencija heksoaminidaze A	AR	Bolest donjih motoričkih neurona	Spora progresija, progresivna distonija, spinocerebelarna degeneracija
	Fazio-Londe sindrom	AR	Progresivna bulbarna paraliza	Ograničena na donje kranijalne živce, progresija do smrti unutar 1-5 godina

Dob nastupa	Poremećaj	Model nasljeđivanja	Klinička svojstva	
			Preklapajuća sa SMA	Razlikovna od SMA
Odraslo doba	Spinalna i bulbarna mišićna atrofija	XL	Proksimalna mišićna slabost, mišićna atrofija, fascikulacije	Ginekomastija, testikularna atrofija, smanjena plodnost
	Amiotrofična lateralna skleroza	AD AR XL	Simptomi oštećenja donjih motoričkih neurona	Progresivna neurodegeneracija; uključenost gornjih i donjih motoričkih neurona

AD: autosomno dominantno; AR: autosomno recesivno; XL: X-vezano

#### 1.4.2. Genetička analiza

Dijagnoza SMA temelji se na genetičkom testiranju koje je vrlo pouzdano i čini prvu liniju pretraga kada se sumnja na SMA (Slika 3). Zlatni standard genetičkog testiranja je kvantitativna analiza *SMN1* i *SMN2* gena pomoću metode istovremenog umnažanja vezanih proba - MLPA (eng. multiplex ligation dependent probe amplification), kvantitativne polimerazne lančane reakcije - PCR-a (qPCR) ili sekvencioniranja novije generacije - NRS-a (eng. next generation sequencing). Homozigotne delecije *SMN1* mogu se identificirati običnim PCR-om nakon razgradnje restriktivnim enzimima. Metoda je brža, jeftinija i dostupnija, ali ne dozvoljava kvantifikaciju broja kopija gena. Kvantitativna analiza *SMN1* važna je za identifikaciju heterozigotnih delecija, dok je broj kopija *SMN2* važan prognostički čimbenik (Mercuri *i sur.*, 2018).

Homozigotna delecija *SMN1* gena osigurat će dijagnozu SMA (Arnold *i sur.*, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a).

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

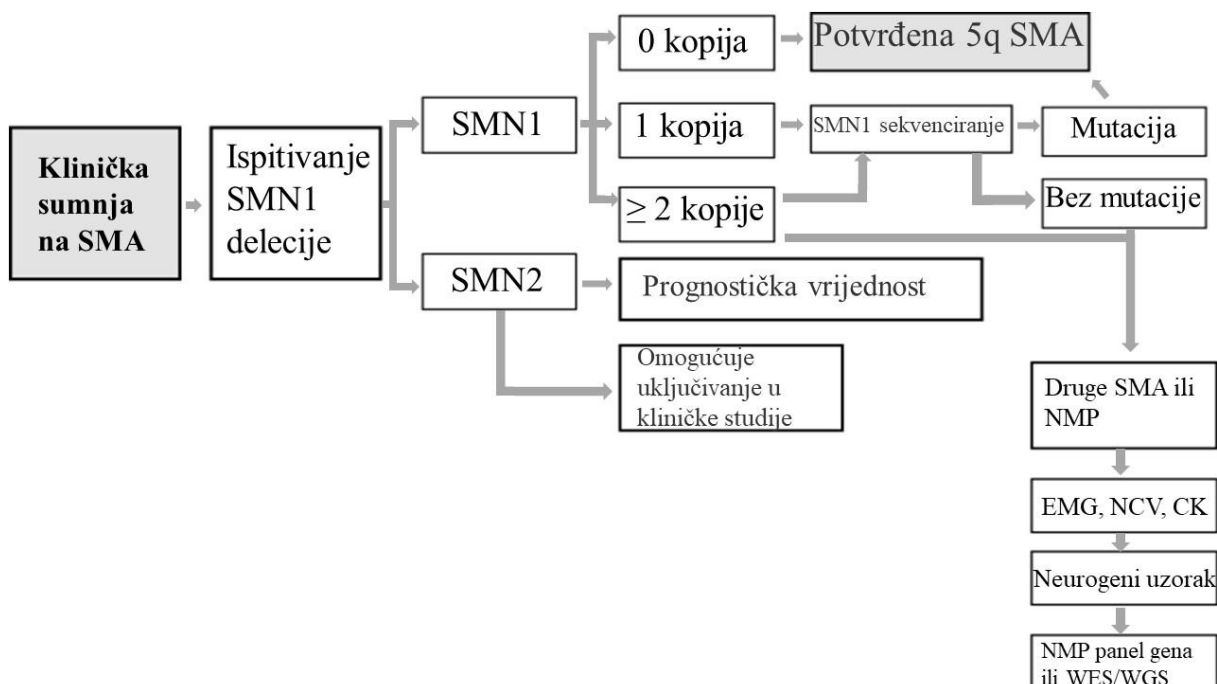
Uz obje kopije *SMN1* gena vjerojatnost SMA je vrlo mala. Međutim *SMN1* bi trebalo sekvencirati u slučaju zapanjujuće tipičnog SMA fenotipa ili krvne srodnosti. U slučaju negativnih rezultata genetičke analize, odnosno prisutnosti intaktnog *SMN1* gena, potrebno je razmotriti druge bolesti koje zahvaćaju motoričke neurone (Tablica 2) (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Određivanje broja kopija *SMN2* gena nije nužno za postavljanje dijagnoze SMA. Međutim, postoji konsenzus kako bi se ono ipak trebalo provoditi jer daje važne prognostičke informacije te je važan kriterij za uključivanje pacijenata u kliničke studije.

Ukoliko se broj kopija *SMN2* gena koristi kao prognostički čimbenik, prilikom savjetovanja oboljelih i njihovih obitelji, potrebno je uzeti u obzir kako korelacija nije apsolutna, te će neki imati drugačiju prognozu od one predviđene na temelju broja kopija *SMN2* gena (Arnold *i sur.*, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a).

Testiranje na prenositelja bolesti je dostupno, a učestalost prenositelja varira od 1/42 do 1/72, ovisno o ispitivanoj populaciji. Određivanje broja kopija *SMN1* gena identificirat će 95 % prenositelja.

Prenatalni probir biopsijom korionskih resica ili analizom DNA dobivene amniocentezom također je moguć (Arnold *i sur.*, 2015).



Slika 3. Dijagnostički algoritam za spinalnu mišićnu atrofiju (preuzeto i prilagođeno prema Mercuri *i sur.*, 2018)

SMA: spinalna mišićna atrofija; SMN1: survival of motor neuron 1; SMN2: survival of motor neuron 2; NMP: neuromuskularni poremećaji; EMG: elektromiografija; NCV: ispitivanje živčane provodljivosti, CK: razina kreatin kinaze; WES: sekvenciranje čitavog egzoma; WGS: sekvenciranje čitavog genoma.

## 2. Obrazloženje teme

Spinalna mišićna atrofija (SMA) uzrokuje ogromnu patnju - fizičku, emocionalnu i financijsku – za oboljele i njihove obitelji. Ova razarajuća bolest manifestira se već u ranom djetinjstvu, teži oblici bolesti imaju vrlo lošu prognozu i veliku stopu smrtnosti, što je i u skladu s činjenicom kako je ova bolest najčešći nasljedni uzrok smrti novorođenčadi. Iako se radi o kroničnoj bolesti, kvaliteta života oboljelih je vrlo niska, a terapija je uglavnom palijativne naravi. Međutim, situacija se počela mijenjati odobravanjem prvog lijeka za SMA, nusinersena, koji je u kliničkim studijama uspio značajno promijeniti tijek bolesti. Unatoč velikom oduševljenju koje je pratilo nusinersen, ubrzo je postalo očito kako će brojni izazovi povezani s njegovom primjenom činiti veliku barijeru prema kliničkoj praksi. Svega tri godine nakon nusinersena, odobrena je prva genska terapija za SMA. Nadalje, u kliničkim studijama je trenutačno nekoliko potencijalnih lijekova koji bi se relativno brzo mogli naći na tržištu. Dinamično područje kakvo je SMA, kako vezano za istraživanja podloge nastanka bolesti, tako i za razvoj terapija koje mijenjaju tijek bolesti, predstavlja veliki izazov za praćenje znanstvenih aktualnosti. Prema tome, cilj ovoga rada bio je proučiti novosti vezane uz sve aspekte SMA, a osobito uz terapiju te pružiti pogled na to kako bi ovo kliničko područje moglo izgledati u budućnosti.

### 3. Materijali i metode

Izrada teorijskog diplomskog rada predstavlja izazov jer zahtijeva detaljno pretraživanje literaturnih podataka o odabranoj temi, kvalitetno proučavanje istih te u konačnici filtriranje relevantnih podataka i njihovo slaganje u smislenu cjelinu. Za pisanje ovog rada korišten je udžbenik iz molekularne biologije. Drugi literaturni izvori pronađeni su pretraživanjem baza podataka Scopus, PubMed, Cochrane Library te internetskih stranica: Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Up To Date, Europske agencije za lijekove (eng. *European Medicines agency*, EMA), američke Agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA), te pripadajućih registara kliničkih studija (eng. *EU Clinical Trials Register; ClinicalTrials.gov*). Stranice raznih SMA udruženja te proizvođača lijekova služile su isključivo za praćenje aktualnosti, ali nisu bile izvor literaturnih podataka. U pretraživanju korištene su sljedeće ključne riječi: *Spinal muscular atrophy, SMN1 gene, SMA pathogeneis, SMN protein, SMA diagnosis, SMA therapy, gene therapy, natural history of SMA, novel SMA therapies*.



## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. Komplikacije SMA

Komplikacije, kao posljedica neuromuskularne slabosti, pogađaju nekoliko organskih sustava: respiratorni, zbog restriktivne bolesti pluća; gastrointestinalni, u obliku disfagije i konstipacije; i mišićnokoštani, u obliku progresivnih deformacija (Iannaccone, 2007). Zbrinjavanje komplikacija izrazito je važno, a oboljeli i njihove obitelji imaju veliku korist od multidisciplinarnog pristupa njezi, koji uključuje stručnjake iz područja neurologije, ortopedije, fizikalne terapije, pulmologije, nutricionizma i gastroenterologije (Darras, 2015; Kolb i Kissel, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018).

Za oboljele od teškog oblika SMA rano uključivanje napredne pedijatrijske ili palijativne njege može pružiti potporu i pomoć roditeljima u donošenju važnih odluka te povećati kvalitetu života oboljele djece (Darras, 2015).

Preporuke za dijagnostiku SMA te zbrinjavanje komplikacija objavljene su prvi puta 2007. godine od strane multidisciplinarnog tima predvođenog Wangom (Wang *i sur.*, 2007). Jedanaest godina kasnije dokument je ažuriran i dopunjen (Mercuri *i sur.*, 2018; Finkel *i sur.*, 2018).

#### 4.1.1. Respiratorne komplikacije

Respiratorne komplikacije glavni su uzrok morbiditeta i mortaliteta u oboljelih od SMA tipa I i II te malog broja oboljelih od tipa III. Respiratorni problemi uključuju slab kašalj s oslabljenim uklanjanjem sekreta donjih dišnih putova, nokturalnu hipoventilaciju, nepotpun razvoj prsnog koša i pluća te rekurentne infekcije (Wang *i sur.*, 2007). Slab kašalj predstavlja problem zbog rizika od rekurentnih infekcija te aspiracije i hipoksemije sekundarno zadržavanju sekreta (D`Amico *i sur.*, 2011; Kolb i Kissel, 2015). Poteškoće gutanja i refluks važni su čimbenici koji doprinose morbiditetu (D`Amico *i sur.*, 2011). Sva djeca sa SMA tipa I te otprilike trećina sa SMA tipa II razviju respiratornu insuficijenciju ili zatajenje tijekom djetinjstva (Arnold *i sur.*, 2015). Najvažnija komplikacija SMA je restriktivna plućna bolest, koja je kod težih oblika SMA pogoršana i razvojem skolioze (Iannaccone, 2007).

Tijekom prošlog desetljeća napravljen je pomak u pristupu zbrinjavanja respiratornih komplikacija, od reaktivnog prema pro-aktivnom. Respiratorna fizioterapija u kombinaciji s mehaničkom insuflacijom-eksuflacijom (npr. Cough Assist™ ili VitalCough™) trebala bi biti primarni način čišćenja dišnih putova kod SMA tipa I i II. Tehnike čišćenja dišnih putova trebalo bi uvoditi pro-aktivno na temelju procjene učinkovitosti kašlja ili vrijednosti vršnog protoka zraka prilikom kašlja (eng. *peak cough flow*). Kod svih oboljelih s neučinkovitim kašljem, kritični dio uklanjanja sekreta iz dišnih putova predstavlja oralna sukcija sekreta primjenom mehaničke pumpe i katetera. Osobe pod povećanim rizikom od stvaranja mukoznog čepa trebalo bi nadzirati tijekom noći primjenom pulsog oksimetra (Kolb i Kissel, 2015). Vest™ sustav za čišćenje dišnih putova ne pomaže uklanjanju sekreta kod osoba s neučinkovitim kašljem. Kod osoba oboljelih od blagog oblika bolesti, prvenstveno kod pokretnih pacijenata, pro-aktivne intervencije nisu indicirane (Finkel *i sur.*, 2018).

Neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom (NIV; dvorazinska tlačna potpora ventilaciji) trebala bi se provoditi kod svih simptomatskih bolesnika. Kod teških oblika bolesti, NIV bi trebalo inicirati prije pojave simptoma respiratornog zatajenja jer rana primjena NIV-a povećava preživljenje i kvalitetu života (Kolb i Kissel, 2015; Finkel *i sur.*, 2018). Kontinuirana neinvazivna ventilacija pozitivnim tlakom (eng. Continuous positive airway pressure, CPAP) ne bi se trebala primjenjivati, osim u određenim slučajevima (npr. u mlađih pacijenata koji nemaju izraženu hiperkapniju ili ne mogu ispravno koristiti NIV). Kada se NIV primjeni s odgovarajućim postavkama, dobro se podnosi, ne utječe na hemodinamsku ravnotežu te može povećati kemoosjetljivost i smanjiti dnevnu hiperkapniju (Kolb i Kissel, 2015)

Invazivna ventilacija trebala bi se koristiti samo u slučajevima kada NIV nije dovoljno učinkovit. Odluka o uvođenju invazivne ventilacije mora se temeljiti na kliničkom statusu, prognozi i mora biti donesena u razgovoru s oboljelim (ukoliko je dob prikladna) i njegovom obitelji (Finkel *i sur.*, 2018).

Nebulizirani bronhodilatatori trebali bi biti dostupni kod sumnje na astmu. Nebulizirane hipertonične otopine za razrjeđivanje sekreta nije preporučljivo koristiti dugotrajno jer nema dokaza koji bi opravdali primjenu. Nadalje, mogu razrijediti sluz normalne viskoznosti i povećati opterećenje pacijenta. Kod hipersalivacije može se primijeniti *glikopirolat*, uz odgovarajući oprez i prilagodbu doze radi sprječavanja isušivanja sekreta i stvaranja mukoznog čepa. Injekcije botulinum toksina tipa A u žlijezde slinovnice, radi smanjenja

produkcije oralnog sekreta, nisu preporučene. Kod teških oblika SMA *palivizumab* bi se trebao primjenjivati tijekom sezone respiratornog sincicijskog virusa (Finkel *i sur.*, 2018).

Primjena antimikrobnih lijekova preporučena je tijekom akutne bolesti zbor rizika od pneumonije i povezanih komplikacija (Kolb i Kissel, 2015).

Rutinska imunizacija protiv pneumokoka, influence i respiratornog sincicijskog virusa je preporučena (Arnold *i sur.*, 2015; Finkel *i sur.*, 2018).

#### 4.1.2. Mišićnokoštane komplikacije

Slabost i smanjena pokretljivost predisponiraju brojnim problemima vezanim za mišićnokoštani sustav. Rano prepoznavanje i prikladna njega važni su zbog održavanja funkcije, sprječavanja propadanja vitalnog kapaciteta i unaprjeđenja kvalitete života.

U nepokretnih pojedinaca sa SMA, kontrakture su česte. Redovne vježbe istezanja uz primjenu ortoza radi očuvanja savitljivosti i prevencije kontraktura zglobova glavni su ciljevi terapije (Wang *i sur.*, 2004; Fujak *i sur.*, 2011).

Skolioza je vrlo česta kod djece koja boluju od SMA tipa I i II, s incidencijom od 60 do 90 % te prezentacijom u ranom djetinjstvu. Kod teško oboljelih, zbog ograničenog životnog vijeka, spinalne komplikacije nisu bile od velike važnosti. Međutim, razvojem cjelokupne terapije i produljenjem životnog vijeka, zbrinjavanje spinalnih komplikacija poprima sve veću važnost (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Pregled kralježnice mora se provoditi redovito, najmanje svakih šest mjeseci. Primjena spinalnih ortoza je preporučena radi pružanja potpore hipotoničnom trupu, usporavanja progresije spinalne deformacije i unaprjeđenja respiratorne funkcije. Ne postoji konsenzus oko vrste ortoza koje bi se trebale primjenjivati. Ortoze ne mogu zaustaviti progresiju skolioze (Arnold *i sur.*, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018). Odluka o kirurškom liječenju skolioze donosi se na temelju vrijednosti Cobbovog kuta ( $\geq 50^\circ$ ), brzine progresije te drugih faktora poput smanjene respiratorne funkcije, hiperkifoze itd. Postoji konsenzus kako se kirurško liječenje deformacija ne bi trebalo provoditi prije 4. godine života (Mercuri *i sur.*, 2018a)

Torakalna insuficijencija je česta te se javlja kao posljedica slabe mišićne potpore trupa, a rezultat je skolioze i deformacije prsnog koša (Mercuri *i sur.*, 2018a).

Nestabilnost kuka je česta, ali rijetko uzrokuje bol. Starije studije ne preporučaju kirurški popravak zbog povećane vjerojatnosti sublukzacije ili dislokacije. Međutim, treba napomenuti kako te studije nisu koristile moderne kirurške tehnike i nisu provedene na mladim odraslim osobama i osobama srednje dobi. Danas, kirurški je postupak indiciran samo kod značajne boli (Mercuri *i sur.*, 2018)

Frakture su uobičajene, a javljaju se kao posljedica osteoporoze, smanjenih razina vitamina D i smanjene pokretljivosti (Mercuri *i sur.*, 2018). Nadalje, sve je više dokaza kako smanjene razine SMN proteina izravno doprinose smanjenoj gustoći kostiju kroz stimulaciju RANK receptora (Nash *i sur.*, 2016).

Svi nepokretni pacijenti trebali bi koristiti invalidska kolica. Preporučaju se modifikacije u okolini i domu radi optimiranja neovisnosti i povećanja sigurnosti (Arnold *i sur.*, 2015; Kolb *i sur.*, 2017; Mercuri *i sur.*, 2018a).

#### 4.1.3. Gastrointestinalne i nutritivne komplikacije

Gastrointestinalne komplikacije su česte u oboljelih od SMA, ali nije poznato javljaju li se sekundarno smanjenoj pokretljivosti i nutritivnim deficitima ili postoji primarni gastrointestinalni poremećaj (Kolb i Kissel, 2015). Problemi uključuju poteškoće hranjenja, disfagiju, gastroezofagealni refluks, usporeno gastrično pražnjenje i konstipaciju (Arnold *i sur.*, 2015; Kolb i Kissel, 2015). Disfagija i umor tijekom hranjenja rezultiraju neadekvatnim rastom i razvojem (Iannaccone, 2007). Navedene su komplikacije češće u pacijenata koji ne mogu sjediti ili stajati (Arnold *i sur.*, 2015).

Svi oboljeli od SMA moraju se podvrgavati redovitim procjenama rasta. Iskusni nutricionist trebao bi biti uključen u izradu prikladne prehrane, nadzor tjelesne mase te unos makro- i mikronutrijenata, osobito kalcija i vitamina D (Mercuri *i sur.*, 2018a).

U svim tipovima bolesti važno je dokumentirati detalje vezane uz simptome GIT-a. Tijekom proteklih nekoliko godina sve je veći broj dokaza o mogućim metaboličkim abnormalnostima u SMA pacijenata, poput metaboličke acidoze, poremećenog metabolizma masnih kiselina, hiperlipidemije, hiperglikemije, hipoglikemije itd. (Mercuri *i sur.*, 2018a)

Najvažniji aspekt nutritivne njege za teško oboljele (*non-sitters*) je omogućiti sigurno gutanje jer bulbarna disfunkcija može rezultirati aspiracijom. Potrebno je napraviti procjenu sposobnosti gutanja i identificirati poteškoće hranjenja. Mišićna slabost, disfagija i

respiratorni problemi uzrokuju smanjen unos hrane i posljedično malnutriciju. (Arnold *i sur.*, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a). Pro-aktivni pristup njezi uključuje kratkotrajno postavljanje nazogastirčne ili nazojejunalne sonde. Dugotrajno rješenje predstavlja gastrostoma. Razdoblja gladi treba izbjegavati jer mogu ubrzati gubitak mišićne mase (Arnold *i sur.*, 2015). Adekvatna hidracija, primjena probiotika i lijekova koji reguliraju peristaltiku crijeva može olakšati simptome konstipacije (Mercuri *i sur.*, 2018).

Teško oboljeli (*sitters*) pod povećanim su rizikom od pretilosti zbog smanjene fizičke aktivnosti (Arnold *i sur.*, 2015; Kolb i Kissel, 2015; Mercuri *i sur.*, 2018a) Razdoblja gladi treba ograničiti tijekom akutnih stanja, a unos elektrolita i tekućine važno je nadzirati..

Oboljeli od tipa SMA tipa III rijetko imaju poremećaje poput disfagije i poteškoća hranjenja. Ipak, procjena od strane nutricionista/dijetetičara je preporučena. Najveći problem u ovoj populaciji predstavlja pretilost (Mercuri *i sur.*, 2018a).

## 4.2. Terapija

Donedavno niti jedan lijek nije uspio promijeniti prirodni tijek SMA. Cochrane sustavni pregled iz 2012. godine uzeo je u obzir šest randomiziranih placebo-kontroliranih kliničkih studija učinkovitosti kreatina, fenilbutirata, gabapentina, hormona koji oslobađa tireotropin, hidroksiuree te kombinirane terapija valproata i acetyl-L-karnitina u liječenju SMA. Niti jedna od ovih studija nije pokazala statistički značajne učinke na ishode liječenja u oboljelih od SMA tipa II i III (Finkel *i sur.*, 2018). Međutim, pojavom novih mogućnosti liječenja SMA došlo je do revolucionarne promjene tog kliničkog područja (Kariyawasam *i sur.*, 2018). U tablici 4 dan je pregled relevantnijih terapija koje su trenutačno u kliničkim studijama.

Tablica 4 Sažet pregled aktualnih terapeutika trenutačno u kliničkim studijama (prema Groen *i sur.* 2018)

Terapijski pristup	Terapeutik	Meta	Stadij kliničkog razvoja
SMN-usmjerena terapija	Nusinersen (ASO)	SMN2 prekrajanje	Odobren (SAD, Europa)
	Male molekule: Risdiplam (RG7916), (Branaplam) LMI070	SMN2 prekrajanje	Faza II Faza I/II
	Genska terapija: Zolgensma (AVXS-101)	SMN1 zamjena	Odobren (SAD)
Neuroprotekcija	Olesoksim	Mitohondrij	Razvoj zaustavljen u Fazi II
Povećanje mišićne reaktivnosti	Reldesemtiv (CK-2127107)	Troponin (aktivator)	Faza II
	SRK-015	Miostatin (inhibitor)	Faza II

ASO: protusmisleni oligonukleotid; SMN: protein preživljenja motoričkih neurona

### 4.2.1. SMN-usmjereni terapeutici

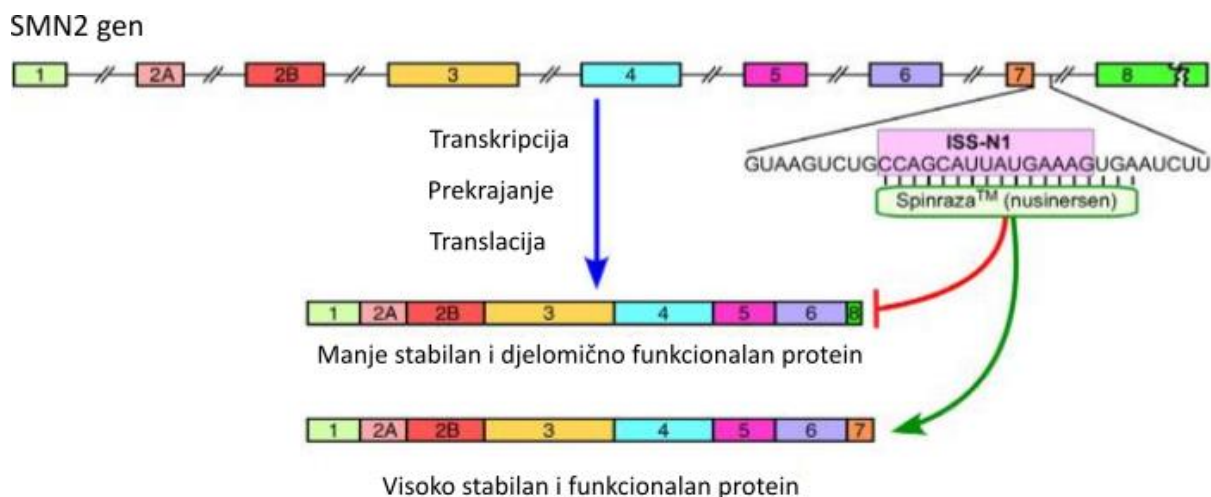
Tijekom prošlog desetljeća, istraživanja usmjerena prema modulaciji *SMN* gena u kralježničkoj moždini i moždanom deblu dovela su do razvoja terapija koje mijenjaju tijek bolesti (eng. *disease-modifying therapy*). Transfer intaktnog *SMN1* gena primjenom adeno-asociranog virusnog vektora te regulacija navise (eng. *up-regulation*) *SMN2* gena, primjenom protusmjernih (*antisense*) oligonukleotida, promijenili su zauvijek ciljeve liječenja SMA (Kariyawasam *i sur.*, 2018).

#### 4.2.1.1. Modulatori SMN gena

##### 4.2.1.1.1. Nusinersen

Nusinersen, poznatiji pod imenom Spinraza<sup>®</sup>, prvi je lijek registriran za terapiju spinalne mišićne atrofije. Klinička studija faze III, prema podacima prijevremene analize (engl. *interim analysis*), bila je toliko uspješna da je ranije prekinuta, nakon čega je uslijedila registracija lijeka od strane FDA u prosincu 2016. godine te EMA-e u srpnju 2017. godine (Shen i Corey, 2017; Wurster i Ludolph, 2018).

Nusinersen je protusmjerni oligonukleotid (engl. *antisense oligonucleotid; ASO*) dizajniran tako da povećava ekspresiju cjelovitog SMN proteina. Mehanizam djelovanja temelji se na komplementarnosti nukleotidnog slijeda lijeka regiji ISS-N1 (*Intronic Splicing Silencer N1*), nizvodno od egzona 7, koja snažno inhibira njegovu inkluziju u zrelu mRNA. Komplementarnim sparivanjem, nusinersen sprječava vezanje prekrajajućih faktora koji su odgovorni za izrezivanje egzona 7, povećavajući njegovu inkorporaciju u zrelu mRNA, i time razine cjelovitog SMN proteina (Slika 4) (Ottesen, 2017; Shen i Corey, 2017; Claborn *i sur.*, 2018).



Slika 4. Mehanizam djelovanja nusinersena (preuzeto i prilagođeno iz Ottesen, 2017)

Spinraza® predstavlja prvi odobreni lijek za terapiju SMA. Egzoni su predstavljeni obojenim pravokutnicima. Introne predstavljaju prekinute linije. Regija ISS-N1 prikazana je nizvodno od egzona 7 u obliku ružičastog pravokutnika. Naznačeno je mjesto vezanja Spinraze®. Proteinski produkti prikazani su ispod.

### Učinkovitost

Provedene su studije sigurnosti, farmakokinetike i učinkovitosti nusinersena u SMA tipa I, II i III. Inicijalne kliničke studije pokazale su kako je nusinersen siguran i podnošljiv te da postoji naznaka kliničke koristi (Chiriboga *i sur.*, 2016; Finkel *i sur.*, 2016). Odluka FDA i EMA-e o registraciji nusinersena temeljila se prvenstveno na rezultatima privremene analize (engl. *interim analysis*), multicentričnog, dvostruko slijepog, placebo kontroliranog, ENDEAR (eng. *Efficacy and Safety of Nusinersen in Infants With Spinal Muscular Atrophy*) kliničkog istraživanja ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02193074). Studija je uključivala 121 dijete u dobi od do 7 mjeseci starosti, nasumično podijeljeno u ispitivanu odnosno kontrolnu skupinu u odnosu 2:1. Svi sudionici bili su neovisni o mehaničkoj ventilaciji i imali barem 2 kopije *SMN2* gena. Lijek je primjenjivan intratekalnim putem 1., 15., 29. i 64. dana uz doze održavanja na 183. odnosno 302. dan. Doza je prilagođena na temelju odnosa dob-volumen cerebrospinalnog likvora. Privremena analiza na 82 pacijenta uključenih u studiju trajanja barem 6 mjeseci pokazala je napredak u ključnim točkama motoričkog razvoja (npr. kontrola glave, sjedenje, udaranje nogama u ležećem položaju, puzanje, stajanje, sjedenje...). Napredak, izmjeren pomoću Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE) funkcionalne ljestvice, primijećen je kod 21 djeteta od njih 51 koji su primali nusinersen (41 %), nasuprot 0 od 27-ero djece (0 %) u kontrolnoj skupini. Ovi rezultati doveli su do



prijevremenog prekida studije zbog dokazane značajne učinkovitosti (Finkel *i sur.*, 2017). Pacijenti koji su završili ENDEAR studiju bili su kvalificirani za uključivanje u „open-label“ studiju naziva SHINE čiji je cilj procijeniti dugoročnu sigurnost i učinkovitost nusinersena. Studija je u tijeku, s predviđenim završetkom u kolovozu 2023. godine. Rezultati nisu dostupni ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02594124).

U konačnoj analizi ENDEAR istraživanja napredak u ključnim točkama motoričkog razvoja primijećen je u 37/73 (51 %) pacijenata liječenih nusinersenom, nasuprot 0/37 (0 %) oboljelih u kontrolnoj skupini. U terapijskoj skupini, ostvarene ključne točke motoričkog razvoja uključivale su kontrolu glave (22 %), rotaciju u ležećem položaju (10 %), samostalno sjedenje (8 %) i stajanje (1 %). U placebo skupini, niti jedno dijete nije dostiglo ključne točke motoričkog razvoja. Nadalje, udio djece koja su preminula ili bila ovisna o trajnoj mehaničkoj ventilaciji ( $\geq 16$  sati dnevno, dulje od 21 dana) bio je manji u skupini koja je primila lijek nego li u kontrolnoj skupini (39 % napram 68 % (Finkel *i sur.*, 2017).

U tijeku je „open-label“ studija faze II NURTURE, koja ocjenjuje učinkovitost nusinersena u liječenju pre-simptomatske djece, starosti 6 tjedana ili manje, kojima je dijagnoza postavljena genetičkim testiranjem. Iako su rezultati privremene analize pozitivni, pri čemu su sva djeca živa i ne trebaju respiratornu potporu nakon 323 dana, 17 % nije moglo samostalno sjediti, 36 % stajati, a 44 % hodati u očekivanim godinama. Završetak studije predviđen je za siječanj 2022. godine ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02386553; De Vivo *i sur.*, 2017).

Dokazi o učinkovitosti za stariju djecu sa SMA temelje se na privremenoj 126 pacijenata (84 pacijenta u skupini s nusinersenom, a 42 u kontrolnoj skupini) u dvostruko-slijepom CHERISH (eng. *Choosing Healthy Eating for Infant Health*) kliničkom istraživanju, koje je uključivalo djecu između 2 i 12 godina. Djeca kvalificirana za sudjelovanje u studiji imala su nastup simptoma nakon 6 mjeseci starosti, bila su sposobna sjediti samostalno, ali ne i hodati. Očekivani životni vijek iznosio je više od 2 godine. Kriteriji za isključivanje iz studije bili su respiratorna insuficijencija (tj. potreba za invazivnom ili neinvazivnom ventilacijom više od 6 sati unutar 24 sata), potreba za hranjenjem putem gastične cijevi, teške kontrakture ili skolioza i kaheksija ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02292537; Mercuri *i sur.*, 2018b). Istraživanje je zaustavljeno nakon privremene analize, zbog pronađene značajne koristi. Oboljeli koji su završili studiju bili su automatski kvalificirani za uključivanje u već spomenutu SHINE studiju (Claborn *i sur.*, 2018). U završnoj analizi, pacijenti koji su primili nusinersen imali su prosječno poboljšanje na HFMSE (engl. *Hammersmith Functional Motor Scale-Expanded*) ljestvici od 3,9 bodova nakon 15 mjeseci terapije, nasuprot pada od 1 boda

za one koji su bili u kontrolnoj skupini (95 % CI 3.1-6.7). Razlika od  $\geq 3$  bodova smatrala se klinički značajnom (Mercuri *i sur.*, 2018b).

Na temelju trenutačno objavljenih podataka, nusinersen je ohrabrujuća terapija za oboljele od SMA te izgleda kako nusinersen ima više koristi u pacijenata koji su mlađi i imaju blaži oblik bolesti, odnosno manje komorbiditeta. Rezultati dviju studija faze III pokazali su povoljne kratkoročne učinke u usporedbi s placeboom te nisu prijavljeni značajniji štetni učinci. Međutim, rezultati se ne mogu primijeniti na sve oboljele od SMA jer su samo pacijenti s tipom I, II i III bili uključeni u studije, a dugoročna učinkovitost i sigurnost primjene nije poznata. Nadalje, visoka cijena (jedna doza lijek košta 659.804,42 kn) i intratekalna primjena značajni su faktori koji ograničavaju kliničku primjenu lijeka (Claborn *i sur.*, 2018)

### Štetni učinci

Najčešći štetni učinci povezani s intratekalnom primjenom nusinersena uključuju infekcije respiratornog trakta i konstipaciju. Sažetak opisa svojstava lijeka ističe povećan rizik od trombocitopenije, poremećaja koagulacije i renalne toksičnosti. Rizik treba shvatiti ozbiljno iz nekoliko razloga. Iz kliničkih studija isključene su osobe s trombocitopenijom i renalnom disfunkcijom. Nadalje, u nekih je pacijenata zabilježen pad trombocita ispod donje granice normalnog raspona. I konačno, u studijama drugih *antisense* nukleotida, prije svega volanesorena i IONIS-TTRx-a, javili su se izrazito štetni učinci kao posljedice trombocitopenije. Prema tome, laboratorijska mjerenja broja trombocita, protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena kao i kvantitativna analiza proteina u urinu, preporučena su na početku liječenja te prije svake sljedeće doze lijeka („Spinraza [sažetak opisa svojstava lijeka]“, Shen i Corey, 2017; Claborn *i sur.*, 2018; www.uptodate.com, Neil i Bisaccia, 2019).

Nuspojave poput glavobolje, boli u leđima i povraćanja povezuju se s lumbalnom punkcijom i mogu se smatrati manifestacijama postpunkcijskog sindroma. Također, zabilježeni su slučajevi neopstruktivnog hidrocefalusa koji nije bio povezan s meningitisom ili krvarenjem („Spinraza [sažetak opisa svojstava lijeka]“).

#### 4.2.1.1.2. Male molekule

Male molekule, koje mijenjaju prekrajanje *SMN2* gena, trenutačno ulaze u kliničko područje. Najveća prednost malih molekula je oralna primjena, izbjegavanje invazivnih aplikacija lijeka te ekspresija SMN proteina u perifernim tkivima. Visokoprotočnim *in vitro* pretraživanjem identificirane su dvije molekule visoko-specifične za inkluziju egzona 7, RG7800 i RG7916 (Messina, 2018).

**RG7800.** Sigurnost, podnošljivost, farmakokinetika te farmakodinamika RG7800 ispitivani su u multicentričnoj, randomiziranoj, dvostruko-slijepoj, placebo kontroliranoj studiji na 9 oboljelih od SMA. Nakon jedne doze, razina cjelovite *SMN2* mRNA značajno je porasla te je pronađeno da je učinak ovisan o dozi. Nažalost, dugoročna primjena lijeka (39 tjedana) u majmuna ukazala je na ototoksičnost, zbog koje je studija prekinuta (<http://clinicaltrials.gov> Identifikacija: NCT02240355; Messina, 2018).

**RG7916 (risdiplam).** Studija faze I RG7916 na zdravim dobrovoljcima identificirala je optimalnu dozu i demonstrirala kako RG7916, ovisno o dozi, povećava razinu *SMN2* mRNA u ljudi ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02633709; Sturm *i sur.*, 2019). U tijeku su 4 kliničke studije faze 2, koje procjenjuju sigurnost i učinkovitost u SMA I, II i III pacijenata te pre-simptomatske novorođenčadi do 6 tjedana starosti, kojima je dijagnoza postavljena genetičkim testiranjem (RAINBOWFISH, NCT03779334) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); Messina, 2018). SUNFISH ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02908685) studija ocjenjuje sigurnost, podnošljivost i učinkovitost u oboljelih od SMA tipa II i III u dobi između 2 i 25 godina koji nisu pokretni. Prvi dio studije, čiji je cilj bio ustanoviti sigurnost, farmakodinamiku, farmakokinetiku i optimalnu dozu, je završio. Privremena analiza pokazala je povećanje ekspresije cjelovitog SMN proteina, bez značajnih štetnih učinaka (Mercuri *i sur.*, 2018c). FIREFISH ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT02913482) je „open-label“ studija učinkovitosti risdiplama u SMA oboljelih tipa I, starosti između jednog i sedam mjeseci s dvije kopije *SMN2* gena. Rezultati nisu dostupni. JEWELFISH ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT03032172 ) je „open-label“ studija učinkovitosti i sigurnosti risdiplama u SMA pacijenata koji su prethodno bili uključeni u istraživanja sa *SMN2*-usmjerenim terapeutima. Upisivanje pacijenata trenutačno je u tijeku (Messina, 2018).

**LMI070 (branaplam).** Sigurnost, farmakokinetika, farmakodinamika i učinkovitost branaplama ispituje se u „open-label“ kliničkoj studiji faze I/II, na oboljelima od SMA tipa I, s dvije kopije *SMN2* gena. Predloženi mehanizam kojim branaplam ostvaruje svoje učinke uključuje stabilizaciju tjelešca za prekrajanje (spliceosoma) i povećanje ekspresije cjelovitog

SMN proteina. (<http://clinicaltrials.gov>, NCT02268552; Cheung *i sur.*, 2018). Privremeni rezultati studije ne obećavaju previše. Pet od trinaest pacijenata, početno uključenih u istraživanje, preminulo je zbog progresije bolesti. Međutim, šest pacijenata postiglo je povećanje funkcije od 6-17 bodova, mjereno CHOP-INTEND ljestvicom. Dosadašnji rezultati također ukazuju na prihvatljivu sigurnost i podnošljivost (Deconinck *i sur.*, 2018).

#### 4.2.1.2. Genska terapija

Pojava genske terapije, kao primamljive mogućnosti liječenja monogenih poremećaja, vođena je razvojem sekvenciranja nove generacije (eng. *next-generation sequencing*) i njezine primjene u pretraživanju gena mutiranih u nasljednim oboljenjima. Danas, nekoliko je studija pažljivo dizajnirano kako bi omogućilo zamjenu gena koji su previše ili premalo eksprimirani u raznim poremećajima. Međutim, jedna od najvećih prepreka genske terapije je nemogućnost terapeutika da proдре u specijalizirane stanice, kakve su motorički neuron u neuromuskularnim oboljenjima. Osim toga, za uspješnu gensku terapiju, potrebno je imati nosač (eng. *vehicle*) koji može postići stabilnu, robusnu i ekstenzivnu transdukciju u ciljnim tkivima, bez patogenosti i imunogenosti. Adeno-asocirani virusi (AAV) ispunjavaju navedene uvjete i preferirani su izbor za virusima-posredovanu gensku terapiju (Pattali *i sur.*, 2019).

U pretkliničkim studijama na SMA miševima, zamjena SMN1 gena primjenom adeno-asociranih virusnih vektora rezultirala je raširenom ekspresijom SMN proteina u kralježničkoj moždini i značajno povećanim preživljenjem (Shorrocks *i sur.*, 2018). Daljnje studije u primata pokazale su kako sistemski primijenjen AAV9-SMN1 (adeno-asocirani virus, serotip 9, koji sadrži SMN1 komplementarnu DNA) učinkovito prelazi krvno-moždanu barijeru i dovodi do ekspresije transgena u mozgu, motoričkim neuronima kralježničke moždine, glija stanicama, te perifernim tkivima poput jetre, srca i skeletnih mišića (Bevan *i sur.*, 2011).

Na temelju obećavajućih rezultata pretkliničkih studija, pokrenuta je studija faze I ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT03461289) čiji je cilj bio utvrditi sigurnost i učinkovitost SMN1 genske terapije (AVXS-101, AveXis), primjenom samo-komplementarnog (eng. *self-complementary*), adeno-asociranog virusa serotipa 9 (scAAV9) primijenjenog u jednoj dozi, intravenoznim putem, oboljelima od SMA tipa I s dvije kopije SMN2 gena. U studiju je bilo uključeno 15 oboljelih; troje je dobilo „niske“ doze, a trinaestero

„visoke“ doze lijeka. Klinički tijek oboljelih uspoređen je s kontrolama iz NeuroNEXT studije.

Štetni učinci uglavnom su uključivali porast serumskih razina aminotransferaza koje su se manifestirale u četiri slučaja, ali su se vratile na normalne vrijednosti nakon primjene kortikosteroida. Pri starosti od 20 mjeseci, svi liječeni pacijenti bili su živi i nisu trebali trajnu mehaničku ventilaciju, u usporedbi s preživljenjem od 8 % u kontrolnoj kohorti. U skupini koja je primila visoku dozu, rezultat na funkcionalnoj ljestvici CHOP-INTEND porastao je za 9,8 bodova nakon jednog mjeseca, odnosno 15,4 bodova nakon tri mjeseca, dok je u kontrolnoj kohorti došlo do pogoršanja rezultata. Od 12 pacijenata na visokoj dozi, 11 je moglo kontrolirati glavu, 11 sjediti bez potpore, 9 se moglo rotirati, a dvoje hodati bez potpore. Niti jedna od navedenih ključnih točaka motoričkog razvoja nije ostvarena u kontrolnoj kohorti (Mendell *i sur.*, 2017). Štoviše, većina oboljelih bez ventilacijske ili nutritivne potpore na početku liječenja nije zahtijevala bilo kakvu intervenciju tijekom studije (Messina, 2018).

Nakon završene faze I, započela je multicentrična, „open-label“ klinička studija faze III, intravenozno primijenjene, jednokratne doze AVXs-101, na oboljelima od SMA tipa I, s jednom ili dvije kopije *SMN2* gena i starosti < 6 mjeseci u trenutku doziranja. U privremenoj analizi prijavljeno je povećanje motoričke funkcije prema CHOP-INTEND funkcionalnoj ljestvici, u prosjeku za 6,9 (-4.0-16.0, n=20), 10,4 (2.0-18.0, n=12) i 11,6 (-3.0-23.0, n=9) bodova nakon prvog, drugog, odnosno trećeg mjeseca (Day *i sur.*, 2019). Studija je u tijeku u SAD-u (<http://clinicaltrials.gov>, Identifikacija: NCT03306277 [STRIVE]) i Europi (<http://clinicaltrials.gov>, Identifikacija: NCT03461289 [STRIVE-EU]).

Zbog značajne učinkovitosti pokazane u fazi I, te na temelju dodatnih dokaza o sigurnosti i učinkovitosti u privremenoj analizi faze III, FDA je odobrila registraciju AVXs-101 (onasemnogen abeparvovek-ksio) pod nazivom Zolgensma<sup>®</sup>, u svibnju 2019. godine. Lijek je registriran za liječenje SMA u oboljelih koji su mlađi od 2 godine i imaju homozigotne mutacije *SMN1* gena ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)). U Europskoj Uniji, AVXs-101 dobio je oznaku PRIME te je u procesu ubrzanog pregleda dokumentacije o sigurnosti i učinkovitosti ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Dodatno, u tijeku su još 3 kliničke studije s AVXS-101: 1. Jedna studija utvrđuje sigurnost dugoročne primjene na pacijentima koji su sudjelovali u fazi I kliničkih ispitivanja. Dobrovoljci će se uključiti iz roditeljske studije i biti kontinuirano nadzirani kroz razdoblje od

maksimalno 15 godina ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT03421977 [START]); 2. Zatim, globalna studija učinkovitosti faze III u pre-simptomatskih neonatalnih SMA pacijenata ( $\leq 6$  tjedana starosti u trenutku doziranja) s višestrukim kopijama *SMN2* gena (2-4) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT03505099 [SPR1NT]); 3 I konačno, „open-label“ studija sigurnosti i učinkovitosti intratekalno primijenjene genske terapije za djecu oboljelu od SMA s 3 kopije *SMN2* gena (<http://clinicaltrials.gov>, Identifikacija: NCT03381729 [STORNG]).

Unatoč obećavajućim rezultatima kliničkih studija, virusna genska terapija nije uobičajena u kliničkoj praksi i stoga je potreban veliki oprez i pažljivo nadziranje liječenih pacijenata, kako bi se utvrdila dugoročna učinkovitost i sigurnost (Shorrock *i sur.*, 2018).

#### 4.2.2. SMN-neovisna terapija

Iako je naglasak stavljen na SMN-ovisne strategije, kliničke studije koje istražuju alternativne pristupe sve su brojnije. Osobitu korist od terapijskih pristupa, koji nisu fokusirani na povećanje ekspresija SMN proteina, mogli bi imati pojedinci koji ne podnose ili ne zadovoljavaju uvjete za SMN-ovisnu terapiju. Osim toga, kombinacija različitih pristupa mogla bi dodatno unaprijediti ishode liječenja (Messina, 2018).

##### 4.2.2.1. Neuroprotektivna terapija

**Olesoksim.** Neuroprotektivni spoj koji je pokazivao najviše potencijala u pretkliničkim studijama bio je olesoksim, oralno aktivni stabilizator membrane mitohondrija. Pretkliničke studije pokazale su smanjenje fluidnosti membrane mitohondrija, mišićne denervacije, astroglioze, mikroglijalne aktivacije te smanjen gubitak motoričkih neurona (Sunyach *i sur.*, 2012). Nažalost, nakon dvosturko-slijepe, placebo kontrolirane studije faze II, na SMA II ili nepokretnim SMA III pacijentima razvoj lijeka je zaustavljen zbog razočaravajućih rezultata kliničke studije ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT01302600; Weber *i sur.*, 2019).

#### 4.2.2.2. Povećanje mišićne reaktivnosti

**Reldesemtiv** (CK-2127107). Reldesemtiv je aktivator troponina u brzim vlaknima skeletnih mišića koji usporava oslobađanje kalcija iz kompleksa s troponinom. Sporo oslobađanje kalcija senzitivizira sarkomere na njegove učinke i uzrokuje pojačanu mišićnu kontrakciju (Hwee *i sur.*, 2015). Nastavno na kliničku studiju faze I, koja je demonstrirala sigurnost i učinkovitost, očekuju se rezultati faze II, dvostruko slijepe, placebo kontrolirane studije na pacijentima oboljelima od SMA tipa II i IV ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Identifikacija: NCT0264468; Messina, 2018).

**SRK-015**. Novi pristup povećanju mišićne reaktivnosti predstavlja SRK-015, selektivni inhibitor miostatina, koji promovira rast i diferencijaciju mišićnih stanica u SMA miševa (Feng *i sur.*, 2016). Klinička studija faze I je završena, a u tijeku je faza II koja će utvrditi učinkovitost i sigurnost SRK-015 u oboljelih od SMA tipa II i III (<http://clinicaltrials.gov>, Identifikacija: NCT03921528).

#### 4.2.3. Sadašnjost i budućnost SMA terapije

U terapijskim okolnostima realnog svijeta, važno je prihvatiti trenutačne nesigurnosti i ograničenja koja okružuju postojeće podatke, obuhvaćajući relativno kratke kliničke studije, mali broj pacijenata i primjene različitih i time neusporedivih režima doziranja lijekova kroz studije. Ukupna klinička korist i njezino trajanje u cjelokupnoj SMA populaciji nije poznata, uključujući i nedostatak podataka o učinkovitosti novih terapija kod blažih fenotipova ili pacijenata s duljim trajanjem bolesti (Kariyawasam *i sur.*, 2018).

Odobranje Spinraze® izazvalo je veliko oduševljenje i zauvijek promijenilo klinički „krajolik“ SMA od isključivo simptomatskog pristupa do onog u kojem je terapija koja mijenja tijek bolesti postala stvarnost. Nusinersen je pokazao kako je terapija za teške neuromuskularne bolesti moguća, a njegovo odobranje od strane regulatornih agencija imalo je izražene učinke i na područje istraživanja SMA, ali i drugih neuromuskularnih poremećaja (Groen *i sur.*, 2018).

Međutim, intratekalna primjena te povezani sigurnosni zahtjevi (primjerice, hospitalizacija za teške slučajeve), dodali su značajan teret kliničarima kao i oboljelima i njihovim obiteljima (Messina, 2018). Cijena liječenja velikom je broju javnozdravstvenih sustava prevelika, što će ograničiti dostupnost terapije pacijentima. Razvoj centara koji će biti u mogućnosti pružiti

sigurne i ponovljene lumbarne punkcije tijekom cjeloživotnog razdoblja u pacijenata sa značajnim komorbiditetima izrazito je zahtjevno u smislu vremena, radne snage i kliničkih resursa, što naglašava potrebu za uspostavom infrastrukture i programa potrebnih za potporu pacijenata (Kariyawasam *i sur.*, 2018; Messina, 2018). Nadalje, većina studija na životinjama i ljudima ukazuje na to da je terapiju potrebno započeti što je ranije moguće u svrhu osiguravanja najvećeg mogućeg terapijskog učinka. Posljedično, postoji hitnost uspostave prikladne infrastrukture koja će omogućiti primjenu nusinersena, genske, ali moguće i drugih terapija, odmah nakon uspostave dijagnoze. Kako bi to postalo moguće, programi prenatalnog probira i probira novorođenčadi postat će nužni (Messina, 2018).

Posljedice ulaganja u razvoj novih terapija bit će daleko veće od samih troškova i izazova vezanih uz njihovu primjenu. Uz promjenu prirodnog tijeka bolesti, prema sve više kroničnom obliku, izraženije će postati manifestacije bolesti izvan središnjeg živčanog sustava. Porast će potreba za multidisciplinarnim pristupom njezi oboljelih. Primjerice, napredak u respiratornim intervencijama, fizioterapiji, ortopedskoj i nutritivnoj njezi morat će držati korak s promjenjivim ciljevima liječenja i fenotipom pacijenata (Kariyawasam *i sur.*, 2018). To je već uključeno u nove smjernice standardne njege za oboljele od SMA, koje zagovaraju pro-aktivni pristup zbrinjavanju komplikacija (Mercuri *i sur.*, 2018; Finkel *i sur.*, 2018). Financiranje, radna snaga i logističko planiranje za navedene kliničke domene sukladno će zahtijevati integraciju u holistički paket skrbi za pacijente (Kariyawasam *i sur.*, 2018).

Ulazak genske terapije u kliničku praksu možda će olakšati neke aspekte liječenja (pr., jednokratna doza lijeka, intravenska primjena i sistemska ekspresija SMN proteina) te dodatno unaprijediti kliničke ishode (Messina, 2018; Day *i sur.*, 2019). Međutim, unatoč vrlo ohrabrujućim podacima kliničkih studija, uključujući i Spinrazu<sup>®</sup> i Zolgensmu<sup>®</sup>, malo je vjerojatno kako će SMN-usmjerena terapija samostalno zaustaviti ili spasiti bolesni fenotip (Shorrock *i sur.*, 2018).

Inovativne kliničke studije bit će ključne u pružanju dokaza koji će utvrditi put prema najboljoj mogućoj kliničkoj praksi. Unaprjeđivanje kliničkih ishoda i identifikacija biomarkera omogućit će bolju procjenu učinkovitosti liječenja te smanjiti potreban uzorak u budućim istraživanjima. Dodatno, prilagođavanje i redefiniranje respiratornih i nutritivnih ishoda, te uključivanje povećanja kvalitete života kao ishoda liječenja, odredit će je li lijek doista koristan za pacijente kroz cijeli spektar fenotipova (Kariyawasam *i sur.*, 2018).



Znanstvenici i stručnjaci uključeni u razvoj i testiranje novih terapija bit će suočeni s izazovom uključivanja pacijenata u nova klinička ispitivanja zbog rizika da pacijent bude raspoređen u placebo skupinu ili da dobije neučinkovitu dozu lijeka. Kako već postoje terapije koje su sposobne mijenjati tijek bolesti, pacijenti ili njihovi skrbnici neće biti voljni poduzimati takav rizik (Groen *i sur.*, 2018).

Konačno, veliku dilemu predstavljat će odabir najboljeg terapijskog pristupa, osobito s pojavom sve većeg broja lijekova (Kariyawasam *i sur.*, 2018).

Tablica 5 Terapija: kliničke nesigurnosti i ograničenost podataka (prilagođeno prema

Trenutačne kliničke nesigurnosti	Komentar
Kakva je dugoročna učinkovitost novih terapija?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosadašnji rezultati kliničkih studija pokazali su kratkoročni napredak u motoričkoj funkciji, međutim, u simptomatskih pacijenata terapija nije kurativna, a velik teret bolesti može i dalje perzistirati</li> <li>• Opseg koristi (preživljenje, napredak u motoričkoj funkciji i smanjenje potrebe za suportivnom njegom) još nije utvrđen</li> <li>• Mogu li se klinički učinci lijeka održati ili će s vremenom oslabjeti, još uvijek nije poznato</li> <li>• Granica dobi ili onesposobljenosti iznad koje terapija nije učinkovita nije utvrđena</li> </ul>
Kakva je dugoročna sigurnost novih terapija?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dugoročna sigurnost nije poznata. Akumulacija nuspojava tijekom vremena mogla bi dovesti u pitanje opravdanost primjene terapije, s obzirom na njezinu korist</li> <li>• Akumulacija komorbiditeta tijekom vremena, u usporedbi s malim poboljšanjem motoričke funkcije, mogla bi opteretiti pacijente eventualno većim teretom bolesti i terapije, osobito one s novim, "liječnim SMA 1 fenotipom". Nasuprot tomu, minimalni napredak ostvaren kratkoročno, osobito u motoričkoj funkciji, mogao bi se isplatiti kasnije ukoliko su učinci kumulativni i dugotrajni kroz fenotipski spektar</li> </ul>
Koji faktori utječu na pojedinačnu prognozu i određuju odgovor na terapiju kroz cijeli spektar fenotipova?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kraći tijek bolesti u kliničkim studijama nusinersena i genske terapije, na simptomatskoj djeci oboljeloj od SMA tipa 1, bio je prediktor boljeg odgovora na terapiju</li> <li>• Najbolji učinak ostvaren je kada je nusinersen primijenjen pre-simptomatskoj djeci</li> <li>• Učinkovitost nusinersena u SMA tipa 3 nije poznata</li> <li>• Klinička učinkovitost u pokretnih SMA pacijenata i odraslih nije ocijenjena</li> <li>• Klinička učinkovitost kroz širu SMA populaciju u stvarnim okolnostima nije utvrđena</li> </ul>
Kako se buduće terapije mogu unaprijediti?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SMA je multi-organska bolest i sistemska dostava lijeka, kakvu obećava genska terapija, mogla bi optimirati kliničke ishode</li> <li>• Kombinirana terapija koja povećava razine SMN proteina i cilja putove koji čuvaju/spašavaju funkciju motoričkih neurona kroz životni vijek, mogla bi biti učinkovitija</li> </ul>

*Kariyawasam, i sur., (2018)*

*SMN1*: gen preživljenja motoričkih neurona 1; SMA: spinalna mišićna atrofija

## 5. Zaključci

Spinalna mišićna atrofija (SMA) najčešći je nasljedni uzrok smrti novorođenčadi i drugi najčešći autosomno-recesivni poremećaj u svijetu. Teži oblici bolesti izrazito su razarajuća stanja koja predstavljaju iznimnu patnju za oboljele i njihove obitelji.

Razvojem medicinske tehnologije značajno je porasla kvaliteta skrbi o oboljelima, ali na prirodni tijek bolesti nije se moglo značajnije utjecati.

Od otkrića gena odgovornog za bolest 1995. godine, napravljen je ogroman napredak u razumijevanju etiologije bolesti i patoloških mehanizama. Zahvaljujući uložnim naporima, ali i razvoju drugih grana znanosti, danas po prvi puta možemo utjecati na tijek bolesti.

Odobranjem Spinraze<sup>®</sup> (nusinersen) i Zolgesme<sup>®</sup> (AVXs-101) od strane regulatornih agencija, napravljena je velika prekretnica u liječenju SMA jer kliničko područje koje je uglavnom bilo usmjereno na pružanje palijativne skrbi, po prvi puta može ponuditi nadu oboljelima i njihovim obiteljima.

Međutim, unatoč pozitivnim ishodima kliničkih studija, dugoročne posljedice liječenja i dugoročna učinkovitost nisu poznate. Osim toga, faktori koji određuju pojedinačni odgovor na terapiju nisu identificirani. Uz navedeno, visoki troškovi liječenja, nedostatak infrastrukture i etičke implikacije novih terapija predstavljaju prepreke prema kliničkoj praksi.

Nadalje, malo je vjerojatno kako će SMN-usmjerena terapija samostalno uspjeti zaustaviti ili izliječiti bolest. Kao mogući put u budućnosti nudi se kombinirana terapija, s ciljem istovremenog djelovanja na više meta unutar središnjeg živčanog sustava, ali i periferno. Takav pristup mogao bi se pokazati izrazito korisnim zbog toga što će periferne manifestacije bolesti postajati sve izraženij, kako se fenotip bude mijenjao prema sve više kroničnom obliku.

Konačno, bit će potrebne kliničke studije inovativnijeg dizajna, novi ishodi liječenja, te biomarkeri radi kvalitetnije procjene učinkovitosti i sigurnosti novih terapija i smanjivanja broja ispitanika (veličine uzoraka) u budućim studijama.

## 6. Literatura

Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve*, 2014, 51(2), 157–167.

Bevan AK, Duque S, Foust K, Morales PR, Braun L, Schmelzer L, Chan CM, McCrate M, Chicoine LG, Coley BD, Porensky PN, Kolb SJ, Mendell JR, Burghes AHM, Kaspar BK. Systemic Gene Delivery in Large Species for Targeting Spinal Cord, Brain, and Peripheral Tissues for Pediatric Disorders. *Mol Ther*, 2011, 19(11), 1971–1980.

Bodamer, O. A. *Spinal muscular atrophy*, 2019., <https://www.uptodate.com/home>, pristupljeno 31.5.2019.

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla L, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ott J, Munsat TL, Gilliam TC. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q1 1.2–13.3. *Nature*, 1990, 344(6266), 540–541.

Burghes AHM. When Is a Deletion Not a Deletion? When It Is Converted. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(1) 9–15.

Burghes AHM, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosc*, 2009, 10(8), 597–609.

Burnett BG, Mun E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH. Regulation of SMN Protein Stability. *Mol Cel Biol*, 2009, 29(5), 1107–1115.

Cartegni L, Kraine, AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN. *Nat Genet*, 2002, 30(4), 377–384.

Cheung AK, Hurley B, Kerrigan R, Shu L, Chin DN, Shen Y, O'Brien G, Sung MJ, Hou Y, Axford J, Cody E, Sun R, Fazal A, Fridrich C, Sanchez CC, Tomlinson RC, Jain M, Deng L, Hoffmaster K, Song C, Van Hoosear M, Shin Y, Servais R, Towler C, Hild M, Curtis D, Dietrich WF, Hamann LG, Briner K, Chen KS, Kobayashy D, Sivasankaran R, Dales NA. Discovery of Small Molecule Splicing Modulators of Survival Motor Neuron-2 (SMN2) for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J Med Chem*, 2018, 61(24), 11021–11036

Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, De Vivo DC, Montes J, Norris DA,

Bennett CF, Bishop KM. Results from a phase 1 study of nusinersen ( ISIS-SMN Rx ) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*, 2016, 86 (10), 890-897.

Claborn MK, Stevens DL, Walker CK, Gildon BL. Nusinersen: A Treatment for Spinal Muscular Atrophy“. *Ann Pharmacother*, 2018, 53(1), 1–9.

Clermont O, Bulet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J. Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am J Hum Genet*, 1994, 54(4), 687–694.

*Clinicaltrials.gov*, <https://clinicaltrials.gov>, pristupljeno 1.7.2019.

D`Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6(71), 1–10.

Darras BT. Spinal muscular atrophies. *Ped Clin North Am*, 2015, 62, 743–766.

Day JW, Chiriboga C, Crawford T, DArras BT, Finkel RS, Connolly AM, Iannaccone ST, Kuntz NL, Pena LDM, Schultz M, Shieh PB, Smith EC, Feltner DE, Ogrinc FG, Macek TA, Wells C, Muehring Lm, L`Italien J, Sproule DM, Kaspar BK, Mendell JR. AVXS-101 Gene-Replacement Therapy (GRT) for Spinal Muscular Atrophy Type 1 (SMA1): Pivotal Phase 3 Study (STRIVE) Update (P1.6-058), *Neurology*, 2019, 92(15 Supplement), P1.6-058.

Deconinck N, Born A, Baranello G, Bertini E, Jullien de Pommerol H, Mancilla BG, Goemans N, Pingili R, Praestgaard J, Roubenoff R, Schara U. SMA THERAPIES II AND BIOMARKERS: P.261 Safety and efficacy of the oral splice modulator branaplam in type 1 spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28, S110

Donlin-Asp PG, Bassell GJ, Rossoll W. A role for the survival of motor neuron protein in mRNP assembly and transport. *Curr Opin Neurobiol*, 2016, 39, 53–61.

Dubowitz V. Chaos in the classification of SMA: A possible resolution. *Neuromuscul Dis*, 1995, 5(1), 3–5.

Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy ( SMA type 0 ): an expanding clinical phenotype. *Eur J Ped Neurol*, 1999, 3(2), 49–51.

Dubowitz V, Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Dis*, 2009, 19(1), 69–73.

Duque SI, Arnold W, D+Odermatt P, Li X, Porensky PN, Schmelzer L, Meyer K, Kolb SJ, Schümperli D, Kaspar BK, Burghes AHM A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Ann Neurol*, 2015, 77(3), 399–414.

European Medicines Agency, <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 30.6.2019.

Feng Z, Ling K, Zhao X, Zhou C, Karp G, Welch EM, Naryshkin N, Ratni H, Chen KS, Metzger F, Paushkin S, Weetall M, Ko CP. Pharmacologically induced mouse model of adult spinal muscular atrophy to evaluate effectiveness of therapeutics after disease onset, *Hum Mol Genet*, 2016, 25(5), 964–975.

Finkel RS, Chiriboga CA Vajsaar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*, 2016, 388(10063), 3017–3026.

Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzman AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De Vivo DC. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Eng J Med*, 2017, 377(18), 1723–1732.

Finkel RS, Mercuri E, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, Kirschner J, Iannaccone ST, Crawford TO, Woods S, Muntoni F, Wirth B, Montees J, Main M, Mazzone ES, Vitale M, Snyder B, Quijano-Roy S, Bertini E, Davis RH, Qian Y, Sejersen T. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28(3), 197–207.

Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov>, pristupljeno 1.7.2019.

Fujak A, Kopschina C, Gras F, Forst R, Forst J. Contractures of the lower extremities in spinal muscular atrophy type II. Descriptive clinical study with retrospective data collection. *Ortop Traumatol Rehabil*, 2011, 13(1), 27–36.

Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol*, 2018 61(1), 19–24.

von Gontard A, Zerres K, Backes M, Laufersweiler-Plass C, Wendland C, Melchers P,

- Lehmkuhl G, Rudnik-Schoneborn S. Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Dis*, 2002, 12(2), 30–136.
- Groen EJM, Talbot K, Gillingwater TH. Advances in therapy for spinal muscular atrophy: Promises and challenges. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(4), 214–224.
- Hwee DT, Kennedy AR, Hartman J, Ryans J, Durham N, Malik FI, Jasper JR. The Small-Molecule Fast Skeletal Troponin Activator, CK-2127107, Improves Exercise Tolerance in a Rat Model of Heart Failure. *J Pharmacol Exp Therap*, 2015, 353(1), 159–168.
- Iannaccone ST. Modern Management of Spinal Muscular Atrophy. *J Child Neurol*, 2007, 22(8), 974–978.
- Kariyawasam D, Carey K, Jones KJ, Farrar MA. New and developing therapies in spinal muscular atrophy. *Paediatr Resp Rev*, 2018, 28, 3–10.
- Kirwin SM, Vinette KMB, Gonzalez IL, Abdulwahed HA, Al-Sannaa N, Funange VL. A homozygous double mutation in SMN1: a complicated genetic diagnosis of SMA. *Mol Genet Genom Med*, 2013, 1(2), 113–117.
- Kolb SJ i sur. Natural History of Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *Ann Neurol*, 2017, 82(6), 883–891.
- Kolb SJ, Kissel, JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin*, 2015, 62(3), 831–846.
- Lefebvre S i sur., Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80, 155–165.
- Lefebvre S, Burlet P, Qing L, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, 1997, 16, 265–269.
- Lien LL, Boyce FM, Kleyn P, Brustowicz LM, Menninger J, Ward DC, Gilliam TC, Kunkel LM. Mapping of human microtubule-associated protein 1B in proximity to the spinal muscular atrophy locus at 5q13. *Proc Natl Acad Scis USA*, 1991, 88(17), 7873-7876.
- Lorson CL, SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*, 1998, 19, 74–78.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Scis USA*, 1999,

96(11), 6307–6311.

Lunn MR, Wang CH. Spinal Muscular Atrophy. *Lancet*, 2008, 371, 2120–2133.

Macleod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*, 1999, 3(2), 65–72.

Mendell JR i sur. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*, 2017, 377(18), 1713–1722.

Finkel RS i sur. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28(2), 103–115.

Mercuri E i sur. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy“, *N Engl J Med*, 2018, 378(7), 625–635.

Mercuri E i sur. SMA THERAPIES II AND BIOMARKERS: P.255SUNFISH Part 1: RG7916 treatment results in a sustained increase of SMN protein levels and the first clinical efficacy results in patients with type 2 or 3 SMA. *Neuromuscul Dis*, 2018, 28, 108.

Messina S. New Directions for SMA Therapy. *J Clin Med*, 2018, 7(251), 2–8.

Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AHM, McPherson JD. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7), 1177–1183.

Nash LA, Burns JK, Chardon JW, Kothary R, Parks RJ. Spinal Muscular Atrophy: More than a Disease of Motor Neurons? *Curr Mol Med*, 2016, 16, 779–792.

Neil EE, Bisaccia EK, Nusinersen : A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2019, 24(3), 194–203.

Ogino S, Leonard DGB, Rennert H, Ewens WJ, Wilson RB. Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet*, 2002, 110(4), 301–307.

Ogino S, Wilson RB, Gold B. New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region: Simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12(12), 1015–1023.

Ottesen EW. ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atroph. *Transl Neurosci*, 2017, 8, 1–6.



- Pattali R, Mou Y, Li X-J. AAV9 Vector: a Novel modality in gene therapy for spinal muscular atrophy. *Gene Therapy*. Jun 26. doi: 10.1038/s41434-019-0085-4.
- Prior TW, Finanger E. Spinal Muscular Atrophy Summary GeneReview Scope Suggestive Findings. *Gene Rev*, 2016, 1–25, dostupno na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 15.3.2019.
- Russman BS. Spinal Muscular Atrophy : Clinical Classification and Disease Heterogeneity. *J Child Neurol*, 2007, 22(8), 946–951.
- Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46(4), 1584–1600.
- Shorrock HK, Gillingwater TH, Groen EJM. Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs*, 2018, 78(3), 293–305.
- Singh RN, Howell Mf, Ottesen EW, Singh NN. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, 1860(3), 299–315.
- Spinraza [sažetak opisa svojstava lijeka], <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 1.7.2019.
- Sturm S i sur. A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, RO7034067), a SMN2 splicing modifier“, *Br J Clin Pharmacol*, 2019, 85(1), 181–193.
- Sunyach C i sur. Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology*, 2012, 62(7), 2346–2353.
- Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfes EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto BA. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *Eur J Hum Genet*, 2011, 20(1), 7–32.
- Thomas NH, Dubowitz V. The Natural History of Type 1 (Severe) Spinal Muscular Atrophy. *Neuromuscul Dis*, 1994, 4(5), 497–502.
- Tizzano EF, Finkel RS. Spinal muscular atrophy: A changing phenotype beyond the clinical trial., *Neuromuscul Dis*, 2017, 27(10), 883–889.
- Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmuller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - A literature review. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(124), 1–15.

De Vivo DC, Hwu W, Reyna S, Farwell W, Gheuens S, Sun P, Zhong ZJ, Su J, Schneider E, Bertini E. Interim Efficacy and Safety Results from the Phase 2 NURTURE Study Evaluating Nusinersen in Presymptomatic Infants with Spinal Muscular Atrophy (S46.003). *Neurology*, 2017, 88(16).

Wang CH i sur. Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy. *J Child Neurol*, 2007, 22(8), 1027–1049.

Wang HY, Ju YH, Chen SM, Lo SK, Jong YJ. Joint range of motion limitations in children and young adults with spinal muscular atrophy. *Arch Phys Med Rehab*, 2004, 85(10), 1689–1693.

Weber JJ, Clemensson LE, Schiöth HB, Nguyen HP. Olesoxime in Neurodegenerative Diseases: Scrutinising a Promising Drug Candidate. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jul 5. pii: S0006-2952(19)30257-6.

Wurster CD, Ludolph AC. Nusinersen for spinal muscular atrophy. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, 11, 1–3

Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci*, 1997, 146(1), 67–72.

Zerres K, Davies K. 59th ENMC International Workshop : Spinal Muscular Atrophies : recent progress and revised diagnostic criteria. *Neuromuscul Dis*, 1999, 9, 272–278.

Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural History in Proximal Spinal Muscular Atrophy *Arch Neurol*, 1995, 52, 520–523.

## 7. Sažetak / Summary

Spinalna mišićna atrofija (SMA) je autosomno recesivni poremećaj karakteriziran degeneracijom motornih neurona kralježničke moždine, atrofijom skeletnih mišića i generaliziranom slabošću. Javlja se s učestalosti od otprilike 1/6000 do 1/11000 živih poroda. Bolest je uzrokovana štetnim mutacijama gena za preživljenje motoričkog neurona 1 (engl. *survival of motor neuron 1 gene, SMN1*) i posljedično sniženim razinama SMN proteina. Iako patogeneza nije razjašnjena, vrlo je vjerojatno kako smanjene razine SMN proteina dovode do poremećaja u prekrajanju brojnih gena. Pacijenti se klasificiraju u jedan od pet fenotipskih razreda (SMA 0, SMA I, SMA II, SMA III, SMA IV) na temelju dobi nastupa simptoma i postignutih ključnih točaka motoričkog razvoja. Unatoč klasifikaciji u diskretne razrede, SMA fenotipovi tvore kontinuirani spektar od najtežeg (SMA tip 0) do najblažeg oblika (SMA tip IV), sa značajnim varijacijama unutar pojedinih razreda. Elektromiografija i biopsija mišića su nekada bili osnova za dijagnostiku SMA, međutim, genetsko testiranje na homozigotnu deleciju ili mutaciju *SMN1* gena pokazalo se učinkovitijim i specifičnijim. SMA terapija je donedavno bila uglavnom suportivna i nije utjecala na tijek bolesti, unatoč značajnim naprecima u kvaliteti njege i skrbi za oboljele. Dvadeset godina nakon otkrića *SMN1* gena i njegove uloge u SMA, veliki korak naprijed učinjen je je odobravanjem prvog lijeka za SMA od strane FDA i EMA, antisense oligonukleotida, nusinersena. Međutim, nusinersen je u isto vrijeme stvorio mnoge etičke, medicinske i financijske izazove koji se također odražavaju na nedavno odobrenu prvu gensku terapiju za SMA. U ovom radu dan je opsežan pregled etiologije bolesti, kliničkih manifestacija, dijagnostičkih strategija te razvoja terapije i njihovih implikacija, uz dokaze iz aktualnih kliničkih studija.

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder characterized by degeneration of spinal cord motor neurons, atrophy of skeletal muscle and generalised weakness. Its incidence is approximately 1/6000 to 1/11000 live births. Disease is caused by deleterious mutations of survival of motor neuron 1 gene, SMN1 and subsequently decreased levels of SMN protein. Although pathogenesis isn't clarified, it is very likely that reduced levels of SMN protein lead to disorders in splicing of numerous genes. Patients are classified into one of the five phenotypic classes (SMA 0, SMA I, SMA II, SMA III, SMA IV) based on the age at onset of symptoms onset and achieved motor milestones. Despite the classification in discrete classes, SMA phenotypes form a continuous spectrum from the most severe (SMA type 0) to the most mild form (SMA type IV), with significant variations within individual classes. Electromyography and muscle biopsy were once the basis for SMA diagnostics, however, genetic testing for homozygous deletion or mutation of the SMN1 gene has proven itself more effective and more specific. SMA therapy was, until recently, mainly supportive, and despite huge advances in medical technology and patient care, it didn't have the power to influence natural history significantly. Twenty years after the discovery of the SMN1 gene and its role in SMA, a major step forward was made by approving the first drug for SMA by FDA and EMA, antisense oligonucleotide, nusinersen. However, despite the great enthusiasm within the SMA community, following approval, nusinersen has at the same time created many ethical, medical and financial challenges that are also reflected in the recently approved first gene therapy for SMA. In this paper, I provided comprehensive overview of the aetiology of disease, clinical manifestations, diagnostic strategies and the development of therapeutics and their implications, with evidence from current clinical studies.

## 8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

### Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmakologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA – NAPRECI I IZAZOVI U LIJEČENJU

Ivan Mamić

#### SAŽETAK

Spinalna mišićna atrofiya (SMA) je autosomno recesivni poremećaj karakteriziran degeneracijom motornih neurona kralježničke moždine, atrofijom skeletnih mišića i generaliziranom slabošću. Javlja se s učestalosti od otprilike 1/6000 do 1/11000 živih poroda. Bolest je uzrokovana štetnim mutacijama gena za preživljenje motoričkog neurona 1 (engl. *survival of motor neuron 1 gene, SMN1*) i posljedično sniženim razinama SMN proteina. Iako patogeneza nije razjašnjena, vrlo je vjerojatno kako smanjene razine SMN proteina dovode do poremećaja u prekrajanju brojnih gena. Pacijenti se klasificiraju u jedan od pet fenotipskih razreda (SMA 0, SMA I, SMA II, SMA III, SMA IV) na temelju dobi nastupa simptoma i postignutih ključnih točaka motoričkog razvoja. Unatoč klasifikaciji u diskretne razrede, SMA fenotipovi tvore kontinuirani spektar od najtežeg (SMA tip 0) do najblažeg oblika (SMA tip IV), sa značajnim varijacijama unutar pojedinih razreda. Elektromiografija i biopsija mišića su nekada bili osnova za dijagnostiku SMA, međutim, genetsko testiranje na homozigotnu deleciju ili mutaciju *SMN1* gena pokazalo se učinkovitijim i specifičnijim. SMA terapija je donedavno bila uglavnom suportivna i nije utjecala na tijek bolesti, unatoč značajnim naprecima u kvaliteti njege i skrbi za oboljele. Dvadeset godina nakon otkrića *SMN1* gena i njegove uloge u SMA, veliki korak naprijed učinjen je je odobravanjem prvog lijeka za SMA od strane FDA i EMA, antisense oligonukleotida, nusinersena. Međutim, nusinersen je u isto vrijeme stvorio mnoge etičke, medicinske i financijske izazove koji se također odražavaju na nedavno odobrenu prvu gensku terapiju za SMA. U ovom radu dan je opsežan

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 4 grafička prikaza, 4 tablica i 77 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: spinalna mišićna atrofiya, *SMN1* gen, patogeneza SMA, SMN protein, dijagnostika SMA, terapija SMA, genska terapija, prirodni tijek SMA, nove SMA terapije

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Željka Vanić** izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SPINAL MUSCULAR ATROPHY – ADVANCES AND CHALLENGES IN TREATMENT

Ivan Mamić

#### SUMMARY

Spinal muscular atrophy (SMA) is autosomal recessive disorder characterized by degeneration of spinal cord motor neurons, atrophy of skeletal muscle and generalised weakness. Its incidence is approximately 1/6000 to 1/11000 live births. Disease is caused by deleterious mutations of survival of motor neuron 1 gene, SMN1 and subsequently decreased levels of SMN protein. Although pathogenesis isn't clarified, it is very likely that reduced levels of SMN protein lead to disorders in splicing of numerous genes. Patients are classified into one of the five phenotypic classes (SMA 0, SMA I, SMA II, SMA III, SMA IV) based on the age at onset of symptoms onset and achieved motor milestones. Despite the classification in discrete classes, SMA phenotypes form a continuous spectrum from the most severe (SMA type 0) to the most mild form (SMA type IV), with significant variations within individual classes. Electromyography and muscle biopsy were once the basis for SMA diagnostics, however, genetic testing for homozygous deletion or mutation of the SMN1 gene has proven itself more effective and more specific. SMA therapy was, until recently, mainly supportive, and despite huge advances in medical technology and patient care, it didn't have the power to influence natural history significantly. Twenty years after the discovery of the SMN1 gene and its role in SMA, a major step forward was made by approving the first drug for SMA by FDA and EMA, antisense oligonucleotide, nusinersen. However, despite the great enthusiasm within the SMA community, following approval, nusinersen has at the same time created many ethical, medical and financial challenges that are also reflected in the

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 4 figures, 4 tables and 77 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Spinal muscular atrophy, SMN1 gene, SMA pathogenesis, SMN protein, SMA diagnosis, SMA therapy, gene therapy, natural history of SMA, novel SMA therapies

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željka Vanić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2019.