

Patofiziologija i liječenje spinalne mišićne atrofije

Brzić, Dario

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:398945>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Dario Brizić

Patofiziologija i liječenje spinalne mišićne atrofije

Završni rad

Rijeka, 2024. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Dario Brzić

Patofiziologija i liječenje spinalne mišićne atrofije

Završni rad

Rijeka, 2024. godine

Mentor rada: prof. dr. sc. Ivana Munitić

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT
Undergraduate study
„Biotechnology and drug research“

Dario Brizić

Pathophysiology and Treatment of Spinal Muscular Atrophy
Undergraduate thesis

Rijeka, 2024

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Munitić

Završni rad obranjen je dana: 20. rujna 2024. godine,

pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Jasminka Giacometti, predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Katarina Kapuralin, članica
3. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Rad ima 33 stranice, 7 slika, 1 tablicu i 30 literaturnih navoda

Sažetak

Spinalna mišićna atrofija (SMA) nasljedna je neurodegenerativna bolest koja uzrokuje progresivnu slabost i gubitak mišića. Nastaje uslijed mutacija u *SMN1* genu koji je ključan za preživljavanje motoričkih neurona. Najčešće se javljaju delecije egzona 7 na oba kromosoma, dok se točkaste mutacije rjeđe pojavljuju. Degeneracija motoričkih neurona dovodi do pojave simptoma bolesti uključujući slabost, atrofiju i paralizu skeletnih mišića, koja se širi na respiratorne mišiće te dolazi do problema s disanjem i smrti. *SMN1* gen kodira za SMN (prema eng. *survival motor neuron*) protein koji ima različite uloge u procesima unutar neurona, od kojih su najvažnije one u metabolizmu RNA. Njegov nedostatak dovodi do nepravilne funkcije, a kasnije i smrti neurona, što dovodi do nastanka SMA. Postoji i *SMN2* gen, koji je pseudogen i rijetko daje funkcionalan protein, iako se razlikuje od *SMN1* gena u samo nekoliko nukleotida. Budući da *SMN2* eksprimira SMN protein u malim količinama, povećan broj kopija *SMN2* gena povezuje se s boljim kliničkim ishodom. Nove dijagnostičke metode poput testiranja delecija i točkastih mutacija te rani probir novorođenčadi pomogle su u tretiranju oboljelih jer pacijenti tretirani presimptomatski te u ranoj fazi bolesti imaju veću šansu za preživljavanje i razvitak pravilnih motoričkih funkcija. Razvoj različitih terapija za SMA predstavlja velik iskorak u liječenju ove bolesti, ali i neurodegenerativnih bolesti općenito. Najnovija dostignuća u liječenju SMA uključuju razvoj ciljanih terapija kao što su nusinersen, onasemnogene abeparvovec (genska terapija) i risdiplam. Nusinersen, prvi odobreni lijek za SMA, djeluje tako da sprječava izrezivanje egzona 7 u *SMN2* genu, omogućujući stvaranje funkcionalnog SMN proteina. Genska terapija, posebice onasemnogene abeparvovec, omogućava dostavu funkcionalnog *SMN1* gena u stanice koristeći adeno-združeni virusni vektor, dok risdiplam djeluje kao modifikator prekrajanja *SMN2* gena. Napredak u razumijevanju molekularnih mehanizama, dijagnostičkih metoda i terapijskih opcija za SMA značajno doprinosi poboljšanju kvalitete života oboljelih. Iako je

postignut značajan napredak, daljnja istraživanja ostaju ključna za razvoj još učinkovitijih terapija i poboljšanje kvalitete života pacijenata širom svijeta.

Ključne riječi: spinalna mišićna atrofija, SMN protein, probir novorođenčadi, nusinersen, onasemnogene abeparvovec, risdiplam

Abstract

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a hereditary neurodegenerative disease that causes progressive weakness and muscle loss. It arises due to mutations in the *SMN1* gene, which is crucial for the survival of motor neurons. The most common mutations are deletions of exon 7 on both chromosomes, while point mutations are less frequent. The degeneration of motor neurons leads to the onset of disease symptoms, including weakness, atrophy, and paralysis of skeletal muscles, which extends to the respiratory muscles, leading to breathing difficulties and, ultimately, death. The *SMN1* gene encodes the SMN (survival motor neuron) protein, which plays various roles in neuronal processes, the most important being in RNA metabolism. Its deficiency results in improper neuronal function and, eventually, neuron death, leading to the development of SMA. There is also an *SMN2* gene, which is a pseudogene and rarely produces functional protein, although it differs from the *SMN1* gene by only a few nucleotides. Since *SMN2* expresses the SMN protein in small amounts, an increased number of copies of the *SMN2* gene is associated with a better clinical outcome. New diagnostic methods, such as testing for deletions and point mutations, and early newborn screening, have aided in treating affected individuals since patients treated presymptomatically and in the early stages of the disease have a better chance of survival and developing proper motor functions. The development of various therapies for SMA represents a significant breakthrough in treating this disease, as well as neurodegenerative diseases in general. The latest advances in SMA treatment include the development of targeted therapies such as nusinersen, onasemnogene abeparvovec (gene therapy), and risdiplam. Nusinersen, the first approved drug for SMA, works by preventing exon 7 skipping in the *SMN2* gene, enabling the production of functional SMN protein. Gene therapy, particularly onasemnogene abeparvovec, allows the delivery of a functional *SMN1* gene into cells using an adeno-associated viral vector, while risdiplam acts as a splicing modifier of the *SMN2* gene.

Advances in understanding the molecular mechanisms, diagnostic methods, and therapeutic options for SMA have significantly contributed to improving the quality of life for affected individuals. Although significant progress has been made, further research remains crucial for the development of even more effective therapies and the improvement of patients' quality of life worldwide.

Keywords: spinal muscular atrophy, SMN protein, newborn screening, nusinersen, onasemnogene abeparvovec, risdiplam

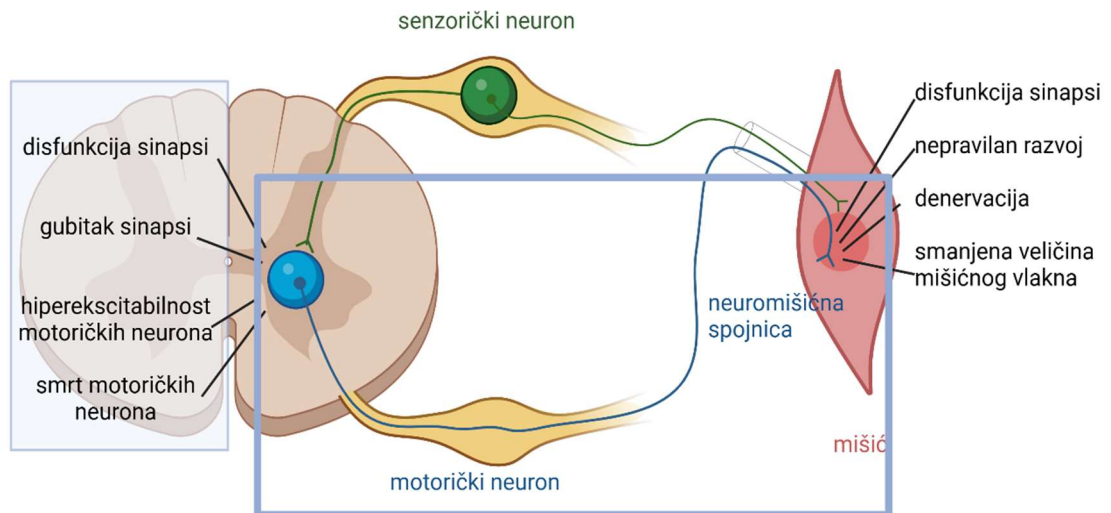
Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Motorički neuroni.....	3
2.	Svrha rada	5
3.	Molekularni mehanizmi SMA	6
3.1.	Uloga SMN proteina	7
3.1.1.	Slaganje spliceosomalnih snRNP	8
3.1.2.	Transport mRNA molekula u aksonima.....	9
3.1.3.	Patofiziologija SMA.....	11
4.	Dijagnostika SMA	13
4.1.	Testiranje točkastih mutacija.....	14
4.2.	Probir novorođenčadi	15
4.3.	Testiranje nosilaca	16
5.	Terapijski pristupi u liječenju SMA	18
5.1.	Nusinersen: terapija <i>antisense</i> oligonukleotidima.....	19
5.1.1.	Klinička istraživanja.....	19
5.1.2.	Mehanizam djelovanja	20
5.2.	Onasemnogene abeparvovec (OA): genska terapija za SMA ...	21
5.2.1.	Klinička istraživanja.....	22
5.2.2.	Mehanizam djelovanja	23
5.3.	Risdiplam	24
5.3.1.	Klinička istraživanja.....	25
5.3.2.	Mehanizam djelovanja	26
6.	Zaključak	28
7.	Literatura	30

1. Uvod

Spinalna mišićna atrofija (SMA) neuromišićna je bolest karakterizirana slabošću, atrofijom i paralizom mišića.(1) SMA se ubraja u bolesti donjeg motoričkog neurona.(2) Bolest se razvija zbog degeneracije alfa motoričkih neurona prednjeg roga leđne moždine.(1,3) SMA je nasljedna bolest koja se nasljeđuje autosomno recesivno.(4) Od SMA oboli 1 od 10 000 do 1 od 20 000 osoba, dok je 1 od 40 do 1 od 70 osoba nosilac genetske mutacije povezane s ovom bolešću. Neliječena SMA predstavlja glavni genetski uzrok smrti u djece. (5) Bolest nastaje zbog bialelne mutacije u *SMN1* genu koji kodira SMN protein (prema eng. *survival motor neuron*) koji je nužan za funkciju i preživljavanje motoričkih neurona u moždanom deblu i leđnoj moždini.(6) Najčešće mutacije su delecije egzona 7, dok se rjeđe pojavljuju točkaste mutacije, insercije, i pogrešne (prema eng.*nonsense*) mutacije. Mutacije ne moraju biti jednake na oba kromosoma te postoje slučajevi u kojima se na jednom kromosomu dogodila delecija, a na drugom neka druga vrsta mutacije. Pored *SMN1* gena, otkriven je i *SMN2* gen koji utječe na razvoj i težinu bolesti.(5) *SMN1* kodira funkcionalan SMN protein, dok se *SMN2* gen, iako srodan *SMN1* genu, rijetko prepisuje u funkcionalan protein zbog točkaste mutacije unutar egzona 7 koja uzrokuje njegovo izrezivanje. Zanimljivo je da se može naslijediti više kopija *SMN2* gena. Što je veća količina kopija *SMN2* gena u bolesnika, veća je šansa da će nastati dovoljno SMN proteina te nastaju blaži oblici bolesti.(4) U većini SMA slučajeva postoji delecija u *SMN1* genu, zbog čega nastaje nestabilan SMN protein koji se ubrzo nakon translacije razgrađuje.(3) Oštećenja različitih neurona dovode do različitih simptoma bolesti, ali u skoro svim slučajevima dolazi do slabosti mišića ruku, nogu, vrata što može izrazito utjecati na kvalitetu života.(4) Češće su zahvaćeni mišići donjih udova, dok se slabost bulbarnih i respiratornih mišića pojavljuje u težim oblicima bolesti. Bulbarni mišići su mišići odgovorni za pokrete lica, gutanje, govor i žvakanje, a respiratorni mišići su međurebreni mišići i ošit, koji omogućavaju disanje. Atrofija respiratornih mišića u SMA glavni je uzrok smrti. Mišići oka većinom

nisu zahvaćeni.(7) Bolest se može podijeliti u više podtipova, ali svi oni povezani su sa slabošću mišića.(4)



Slika 1: Schematski prikaz morfoloških i funkcionalnih abnormalnosti uzrokovanih SMA. Patofiziološke promjene poput: sinaptičke disfunkcije, gubitka motoričkih neurona i smanjenja mišićnih vlakana glavna su obilježja SMA. Preuzeto i modificirano iz (8). Kreirano uz pomoć Biorender-a.

Bolest su prvi opisali Werdnig i Hoffmann 1891. godine.(3) Bilo je potrebno više od stoljeća kako bi se otkrilo koji gen uzrokuje SMA kako bi se moglo pristupiti liječenju same bolesti. Nakon određivanja različitih podtipova bolesti i kromosomskog mapiranja SMA lokusa na 5q13 kromosomu, otkriveno je 1995. godine da su mutacije, posebno delecije egzona 7,u *SMN1* genu zaslužne za razvitak SMA. Tada je počelo drugo razdoblje istraživanja mogućih terapija za SMA, obilježeno istraživanjima uloga *SMN1* i *SMN2* gena te različitim pokušajima tretiranja bolesti. Treće razdoblje istraživanja SMA počelo je 2016. godine kada su odobreni prvi lijekovi za SMA te se počeo provoditi probir („screening“) novorođenčadi, kao metoda dijagnosticiranja SMA.(5) Probir novorođenčadi pomaže u tretiranju bolesti jer se s liječenjem može krenuti prije pojave simptoma što usporava razvoj bolesti.(4) Iako je danas, zahvaljujući dostupnim

tretmanima, moguće spriječiti nastanak težih oblika SMA, još uvijek se radi na razvoju novih lijekova kako bi se život oboljelih poboljšao i produžio.(5)

1.1. Motorički neuroni

Motorički neuroni zajednički je naziv za skupinu neurona, skeletnog živčanog sustava, koji osiguravaju voljne i nevoljne pokrete tijela inervirajući skeletne mišiće.(2,9) Razlikujemo dvije skupine motoričkih neurona: gornje i donje motoričke neurone. Tijela gornjih motoričkih neurona nalaze se u korteksu mozga, odakle se spuštaju do moždanog debla ili leđne moždine gdje stvaraju sinapse s donjim motoričkim neuronima. Tijela donjih motoričkih neurona nalaze se u moždanom deblu i leđnoj moždini te dalje inerviraju mišiće i žlijezde u tijelu.(2)

Gornji i donji motorički neuroni zajedno stvaraju i prenose signale koji su odgovorni za nastanak pokreta.(2) Kako bi došlo do pokreta, u primarnom motoričkom korteksu mozga procesuiraju se signali iz različitih dijelova mozga i nastaju signali koji se šalju do skeletnih mišića kako bi nastao pokret. Primarni motorički korteks nalazi se u precentralnoj vijugi i u tom dijelu mozga nalaze se tijela gornjih motoričkih neurona koja se nazivaju Betzove stanice.(9) U njima se integriraju stimulirajući ili inhibirajući signali koji se prevode u signale koji stimuliraju ili zaustavljaju nastanak pokreta. Njihovi aksoni protežu se prema donjim dijelovima kroz unutarnju moždanu čahuru (lat. capsula interna), cerebralne pedunkule u srednjem mozgu, pontinska vlakna te na kraju medularne piramide.(2) U medularnim piramidama vlakna se križaju i nastavljaju kao bočni kortikospinalni trakt, koje se veže na donje motoričke neurone.(2,9) Vlakna koja se ne križaju u medularnim piramidama čine prednji kortikospinalni trakt odgovoran za kretanje i kontrolu mišića trupa.(9)

Donji motorički neuroni prenose signale od gornjih motoričkih neurona do mišića koji izvode pokret.(2) Spoj aksona donjih motoričkih neurona i mišićnih vlakana naziva se neuromišićna spojnica. Sinaptički kraj

motoričkih neurona izlučuje acetilkolin koji se veže na receptore mišićnog vlakna te nastaje pokret.(9)

Donji motorički neuroni nalaze se u moždanom deblu odakle se dalje dijele u tri skupine: alfa, beta i gama motoričke neurone.(2) Alfa motorički neuroni inerviraju vanjska (ekstrafuzalna) mišićna vlakna i glavni su u kontrakcijama skeletnih mišića. Tijela alfa motoričkih neurona nalaze se u moždanom deblu ili prednjem rogu leđne moždine. Beta motorički neuroni su slabo istraženi, ali je dokazano da inerviraju i vanjska (ekstrafuzalna) i unutarnja (intrafuzalna) mišićna vlakna. Gama motorički neuroni inerviraju mišićna vretena i određuju njihovu osjetljivost. Oni nemaju direktnu motoričku funkciju, nego se aktiviraju zajedno s alfa motoričkim neuronima i usklađuju mišićne kontrakcije.(2)

2. Svrha rada

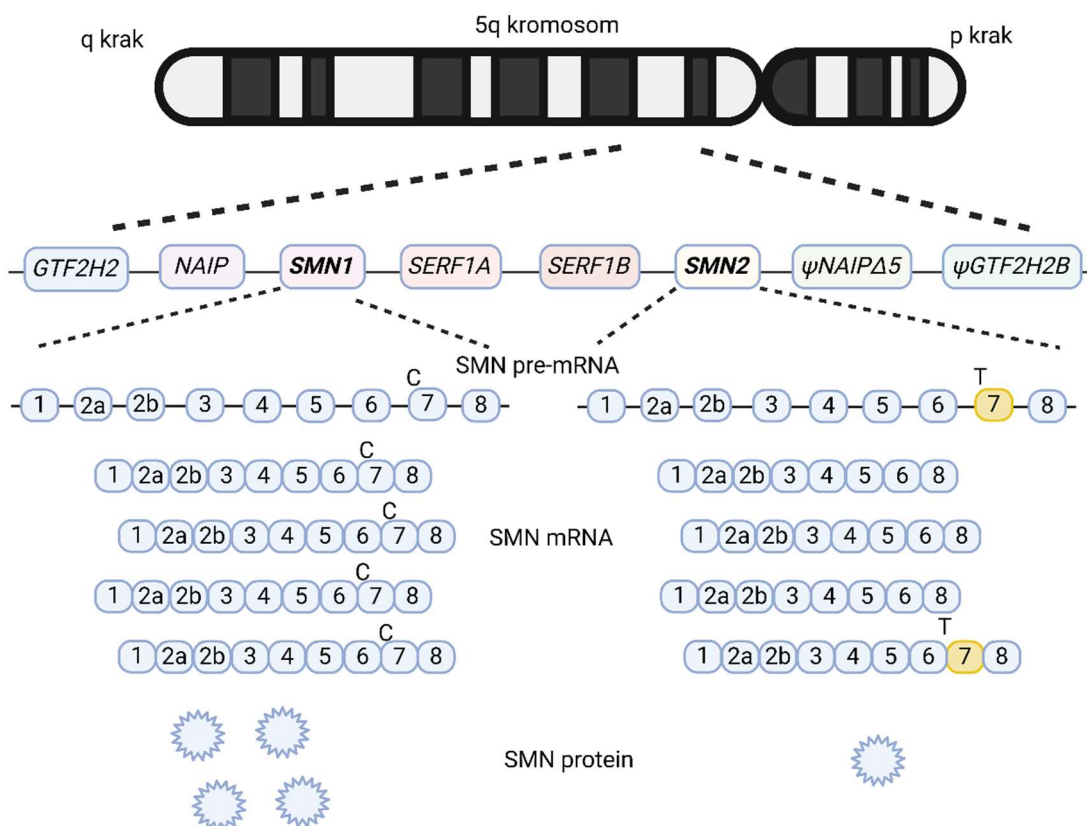
Spinalna mišićna atrofija (SMA) neuromuskularna je bolest koja se očituje degeneracijom donjih motoričkih neurona prednjeg roga leđne moždine. Gubitkom motoričkih neurona dolazi do slabosti i atrofije skeletnih mišića.(1,3) SMA se nasljeđuje autosomno recesivno te su potrebne delecije i/ili točkaste mutacije na oba kromosoma kako bi se bolest razvila. *SMN1* gen je gen koji kodira za SMN protein koji osigurava normalnu funkciju motoričkih neurona.(6) Dostupni lijekovi za SMA djeluju tako da sprječavaju dalji razvoj bolesti, čime se poboljšava kvaliteta života oboljelih, ali nije moguće vratiti funkciju zahvaćenih neurona i mišića. (Nishio et al., 2023)

Svrha rada je:

- Prikazati genetičke i molekularne mehanizme zbog kojih nastaje SMA. Dodatnim razumijevanjem patologije SMA moguće je potaknuti nova istraživanja koja bi upućivala na specifične terapijske mete kako bi se oboljelima poboljšala kvaliteta života i produžio životni vijek.
- Prikazati dijagnostičke metode koje se koriste u dijagnostici SMA. Posljednjih godina napretkom u dijagnostici produžio se životni vijek oboljelih. Ako se bolest otkrije prije nego se pojave prvi simptomi i krene se s odgovarajućom terapijom, moguće je usporiti napredak te ne dolazi do težih oblika bolesti.
- Prikazati trenutno korištene terapije te terapije u kliničkim ispitivanjima. Ovaj rad bavit će se pregledom i analizom dostupnih terapija, njihovom učinkovitošću i sigurnošću te ukazati na potencijalne mane određenih terapija u određenim skupinama. Također, ovaj rad pružit će uvid i u nove terapijske metode kao moguću budućnost liječenja ove bolesti.

3. Molekularni mehanizmi SMA

SMA je nasljedna bolest koja se nasljeđuje autosomno recesivno.(10) Gen koji uzrokuje SMA, *SMN1*, nalazi se na dugom kraku petog kromosoma (5q13).(7) Postoje dva homologna gena *SMN1* i *SMN2*. *SMN1* gen nalazi se na telomernom dijelu petog kromosoma, dok se *SMN2* nalazi na centromernom dijelu. Obrnuta duplikacija regije *SMN1* gena dovela je do nastanka centromernog, homolognog gena *SMN2*. *SMN2* gen jedinstven je za čovjeka. Ova dva gena razlikuju se u samo nekoliko nukleotida (Slika 2) (10) Oba su gena građena od 9 egzona i kodiraju za SMN protein građen od 294 aminokiseline.(7) Posljednji egzon oba gena se ne prepisuje. Iako se *SMN1* i *SMN2* razlikuju u samo nekoliko baza, zbog promjene citozina (C) u timidin (T) u *SMN2* unutar egzona 7, dolazi do prekrajanja egzona 7 u nezreloj, glasničkoj RNA (pre-mRNA) te nastaje nestabilan SMN protein koji se ubrzo nakon razgrađuje.(11)



Slika 2: Prikaz kromosoma 5 i regija koje se povezuju s nastankom SMA. Zbog promjene C u T u *SMN2* genu, dolazi do nastanka nefunkcionalnog

SMN proteina. Preuzeto i modificirano iz (10) Kreirano uz pomoć Biorendera

Delecije egzona 7 najčešće su mutacije, koje dovode do nastanka SMA, dok se točkaste mutacije, delecije i konverzije *SMN1* u *SMN2* rjeđe pojavljuju.(10) Otprilike 5%-10% SMN proteina nastalog prepisivanjem *SMN2* gena je funkcionalno te se broj kopija *SMN2* gena povezuje s različitim kliničkim fenotipovima SMA. (Tablica 1) (7,11) Pored broja kopija *SMN2* gena kriteriji za klasifikaciju SMA bili su dob, u kojoj su se razvili prvi simptomi bolesti, i motoričke funkcije koje je osoba mogla obavljati.(12)

Tablica 1: Klasifikacija kliničkih fenotipova SMA (7)

Tip SMA	Dob	Motoričke funkcije	Broj kopija <i>SMN2</i> gena	Životni vijek
Tip 0	Prenatalno	Nemogućnost sjedenja i kontroliranja glave	1	Nekoliko tjedana
Tip 1	0-6 mjeseci	Nemogućnost sjedenja	1-2	Dvije godine
Tip 2	<18 mjeseci	Samostalno sjedenje, ali nemogućnost hodanja	3	25 godina
Tip 3	>18 mjeseci	Samostalno hodanje	3-4	Normalan životni vijek
Tip 4	Odrasla dob	Samostalno hodanje	4 ili više	Normalan životni vijek

3.1. Uloga SMN proteina

SMN protein postao je tema od interesa nakon otkrića da mutacije u *SMN1* genu uzrokuju nastanak SMA. Iako se prvo smatralo da se ovaj protein eksprimira samo u neuronima, kasnija otkrića pokazala su da se SMN može pronaći u svim stanicama.(11) SMN protein može se pronaći u jezgri i citoplazmi. U jezgri se nakuplja i tvori strukture koje dolaze u interakciju s Cajalovim tjelešcima, što je dokaz da SMN protein ima ulogu u metabolizmu molekula ribonukleinskih kiselina (RNA).(13) SMN protein

građen je od: N – terminalnog kraja, lizinom bogate domene, Tudor domene, prolinom bogate domene i tirozinom i glicinom bogate domene (YG kutija), (prema eng. „YG box”)(11) Svaka domena ima određenu ulogu, N – terminalni kraj veže se na Gemin proteine, Tudor domena veže se na argininom i glicinom bogate regije drugih proteina poput Sm proteina, a YG kutija je zaslužna za oligomerizaciju SMN proteina.(13) Nastali SMN kompleks ima važnu ulogu u sklapanju spliceosomalnih, malih, jezgrinih ribonukleoproteina (snRNP).(14) Pored slaganja spliceosomalnih snRNP, neke od uloga SMN proteina su: pomoć u unutarstaničnom transportu, interakcija s ribosomima i regulacija translacije, regulacija dinamike citoskeleta, regulacija endocitoze i autofagija.(11)

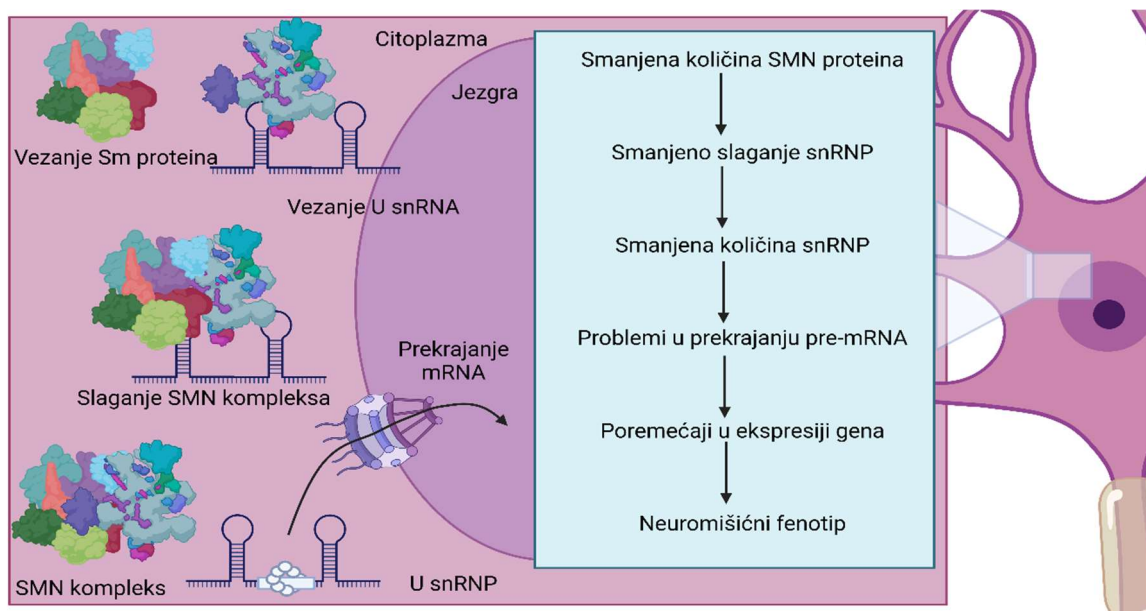
3.1.1. Slaganje spliceosomalnih snRNP

Spliceosomalni snRNP su multikomponentne čestice zadužene za prekrajanje, odnosno uklanjanje introna nezrelih, glasničkih RNA molekula (pre-mRNA).(11,15) Slaganje snRNP događa se pod djelovanjem SMN kompleksa, koji je izuzetno stabilan pri različitim uvjetima.(14) Glavna komponenta snRNP su male, jezgrine RNA (snRNA) molekule koje sintetizira RNA polimeraza II.(15) Nastanak snRNP počinje u jezgri, gdje se prepisuju uridinom bogate snRNA molekule (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac, U6atac), koje se zatim premještaju u citoplazmu.(11) Prije izlaska iz jezgre snRNA prolazi procese dodavanja 7-metil gvanozin kape na 5' kraju i izrezivanja 3' kraja, nakon čega se na nastalu nezrelu snRNA (pre-snRNA) veže kompleks proteina za izvoz iz jezgre, koji disocira s pre-snRNA nakon izlaska iz jezgre.(14)

U citoplazmi SMN kompleks služi kao šaperon u nastanku snRNP i njihovoj translokaciji u jezgru.(11,15) SMN kompleks osigurava specifičnost vezanjem Gemin5 proteina na nastalu pre-snRNA, nakon čega se na nju veže sedam Sm proteina, pod djelovanjem Gemin2 proteina, tvoreći prstenastu strukturu (Slika 3) (11) Trimetil gvanozin sintetaza 1 potom hipermetilira 7-metil gvanozin kapu pre-snRNA na 5' kraju, dovodeći do nastanka trimetil gvanozin (TMG) kape, dok se 3' kraj izrezuje, čime nastaje

zrela snRNA.(14,15) TMG kapa i Sm prsten služe kao nuklearni lokalizacijski signali. (11) Kompleks unosa u jezgru, kojeg čine snurportin i importin- β , veže se na TMG kapu, a SMN dolazi u direktnu interakciju s importinom- β preko WRAP 53, koji usmjerava SMN kompleks prema Cajalovim tjelešcima.(11,14) snRNA disocira s SMN kompleksa te se u Cajalovim tjelešcima događa dalje sazrijevanje snRNP.(13)

Testiranja na stanicama osoba oboljelih od SMA i mišjim modelima pokazala su povezanost između smanjenja nivoa snRNP-a i težih oblika bolesti (Slika 3) (11) Ovakva povezanost javlja se u kasnijim stadijima bolesti, nakon pojave smanjenja motoričkih funkcija.(16)



Slika 3: Mehanizam slagjanja snRNP. Slaganje snRNP jedna je od glavnih uloga SMN proteina. Nedostatak SMN proteina dovodi do smanjenog slagjanja snRNP, što dovodi do poremećaja prekrajnja pre-mRNA i smanjene ekspresije gena. Preuzeto i modoficirano iz (13) Kreirano uz pomoć Biorender-a

3.1.2. Transport mRNA molekula u aksonima

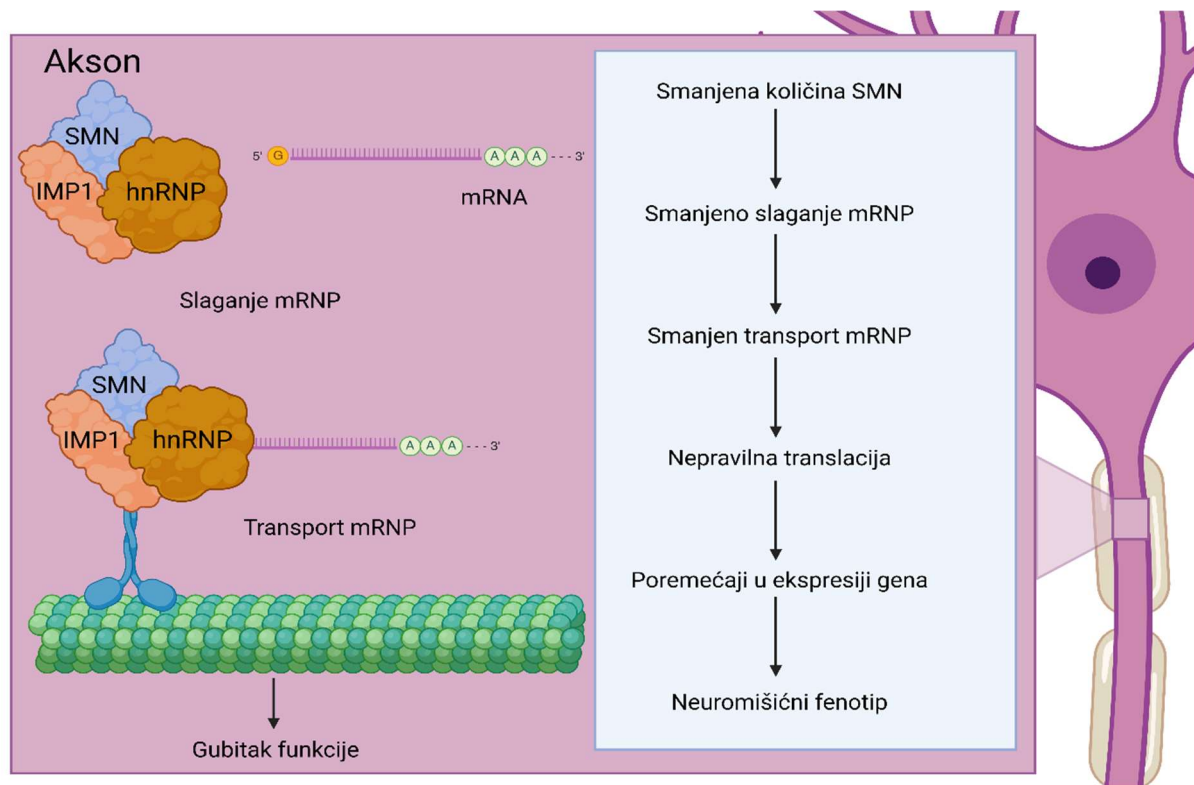
SMN protein nalazi se u jezgri motoričkih neurona za vrijeme razvoja neurona, dok se u zrelim neuronima nalazi u citoplazmi. Pravilnu

lokalizaciju SMN proteina u citoplazmi omogućava protein neurokohondrin.(11) U aksonima SMN protein zajedno s nekim elementima SMN kompleksa, poput Gemin2, dolazi u interakciju s RNA vezujućim proteinima (RBP, prema eng. *RNA binding protein*) i mRNA molekulama.(17) Interakcija SMN proteina i RBP-a pokazuje da SMN protein ima ulogu u održavanju stabilnosti mRNA, transportu i translaciji. Poremećaji u navedenim procesima dovode do slabljenja funkcije neurona i nastanka bolesti.(13) SMN protein regulira rast neurita svojom ulogom u unutarstaničnom prijenosu mRNA molekula. (Slika 4) (14) Deficijencije SMN proteina uzrokuju smanjenu lokalizaciju RBP i mRNA u aksonima i konusu rasta neurona u razvoju. Ovakvi neuroni pokazuju smanjenu duljinu neurita i manji konus rasta. (13)

SMN protein zajedno s hnRNP R (heteronuklearni RNP) doprinosi pravilnoj lokalizaciji mRNA za β -aktin u konus rasta.(14) SMN protein se zajedno s Gemin2, Gemin3 proteinima i β -aktin mRNA veže na α -COP podjedinicu COPI vezikula koje su dio vezikularnog transportnog sustava Golgijeva aparata.(11,14) COPI vezikule sudjeluju u unutarstaničnom transportu u neuritima i važne su za sazrijevanje neurona. Uklanjanje α -COP podjedinice dovodi do nepravilne lokalizacije SMN proteina i smanjene formacije neurita, što je dokaz uloge SMN proteina u rastu neurona i formaciji aksonalnog i sinaptičkog citoskeleta.(11)

SMN protein pored hnRNP R dolazi u interakciju i s drugim RBP što ga povezuje i s drugim bolestima motoričkih neurona poput amiotrofične lateralne skleroze (ALS).(11) RPB povezani s ALS-om - FUS (prema eng. *fused in sarcoma*) i TDP-43 (prema eng. *TAR DNA-binding protein 43*) - mogu se pronaći unutar jezgre kao nakupine zajedno s SMN proteinom, što

dovodi do nakupljanja snRNA u jezgri.



Slika 4: Uloga SMN proteina u transportu mRNA u aksonima. SMN protein ima važnu ulogu u transportu mRNA molekula u aksonima. Nedostatkom SMN proteina dolazi do smanjenog transporta mRNA u aksonima što dovodi do nepravilnog rasta i sazrijevanja neurona. Preuzeto i modificirano iz (13) Kreirano uz pomoć Biorender-a.

3.1.3. Patofiziologija SMA

SMA karakterizirana je gubitkom donjih motoričkih neurona i posljedičnom atrofijom mišića.(18) Nedostatak SMN proteina zbog različitih mutacija, poput delecija i točkastih mutacija, dovodi do nastanka nefunkcionalnog proteina, što dovodi do nastanka SMA. Mutacije u *SMN1* dovode do nastanka nefunkcionalnog proteina koji ne može oligomerizirati te se takav protein degradira. Blaže mutacije dovode do nastanka proteina koji može oligomerizirati s SMN proteinom divljeg tipa, što dovodi do bolje kliničke prognoze. Mutacije poput promjene C u T unutar 7 egzona te *missense* mutacije u egzonu 6 dovode do izrezivanja egzona 7, čime nastaje nefunkcionalan protein koji ne može oligomerizirati što dovodi do

gubitka funkcije SMN proteina u neuronima. Druga grupa mutacija su one koje dovode do smanjene mogućnosti vezanja Sm proteina za SMN. Blaže mutacije omogućavaju vezanje Sm proteina na SMN, dok u težim mutacijama nije moguća oligomerizacija Sm proteina i SMN te slaganje snRNP nije moguće. (18) Proces slaganja snRNP ključan je za proces prekrajanja pre-mRNA molekula te gubitkom ove funkcije SMN proteina dolazi do smanjene proizvodnje funkcionalnih mRNA molekula, čime se smanjuje količina proteina potrebnih za normalnu funkciju neurona.(10,19) SMN također ima ulogu i u transportu mRNA molekula u aksonima što je važno u razvoju neurona.(19) Smanjenom količinom SMN proteina u neuronima dolazi do apoptoze.(20)

SMN protein važan je i u neuromišićnoj spojnici.(20) Neuromišićna spojnica mjesto je kontakta motoričkih neurona i mišićnih vlakana. SMN protein nalazi se u presinaptičkom dijelu neuromišićne spojnice gdje ima važnu ulogu u transportu mRNA molekula u razvoju neurona. Smanjene količine SMN proteina sprječavaju normalno sazrijevanje neurona i dovode do smanjene neurotransmisije. Izostanak sazrijevanja neurona i smanjenje prijenosa signala s neurona na mišićna vlakna povezani su s apoptozom motoričkih neurona i slabosti mišića.(20)

4. Dijagnostika SMA

Prije otkrića *SMN1* gena, SMA se dijagnosticirala biopsijom mišića, kako bi se na osnovu promjena u mišićnim vlaknima isključile druge mišićne bolesti.(5) Otkrićem *SMN1* gena dijagnostika SMA je napredovala te se danas testiranja provode na osnovu mutacija u *SMN1* genu. Postavljanje dijagnoze SMA započinje prepoznavanjem kliničkih karakteristika poput slabosti mišića, većinom mišića nogu, slabosti mišića vrata te ostalih karakteristika navedenih u Tablici 1.(3)

Budući da osobe oboljele od SMA u 95% slučajeva imaju deleciju sedmog egzona *SMN1* gena, prva testiranja vrše se upravo na tom dijelu gena.(7) Multiplex ovisna ligacijska metoda umnožavanja proba (MLPA prema eng. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) jedna je od najčešće korištenih metoda prilikom otkrivanja delecija zbog svoje visoke osjetljivosti te mogućnosti da odredi broj kopija *SMN1* i *SMN2* gena.(7) MLPA je tehnika za kvantitativnu i kvalitativnu analizu ciljane sekvence nukleinskih kiselina hibridizacijom proba, ligacijom i amplifikacijom pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR, prema eng. *polymerizase chain reaction*).(21)

Liječenje SMA uspješnije je ako se bolest tretira presimptomatski te je probir novorođenčadi pomogao u liječenju oboljelih.(4) Probir se provodi na osnovu DNA izolirane iz korionskih resica ili amnionske tekućine pomoću kvantitativne PCR metode u stvarnom vremenu (qRT-PCR prema eng. *quantitative real time PCR*) koja cilja egzon 7 *SMN1* gena koji je mutiran u 95% pacijenata.(4,7) Ova metoda visoko je učinkovita i precizna te ne daje lažno pozitivne rezultate. Probir novorođenčadi trebao bi pomoći u liječenju prije razvitka težih oblika bolesti.(4)

Nove dijagnostičke metode pomogle su u otkrivanju bolesti i poboljšale mogućnost liječenja oboljelih te se invazivnije procedure poput biopsije mišića više ne koriste kao prvi izbor.(7) Ukoliko se kod pacijenta pronađu

dvije normalne kopije *SMN1* gena, treba se uzeti u obzir i druge poremećaje motoričkog neurona poput kongenitalne miopatije i mišićne distrofije.(7)

4.1. Testiranje točkastih mutacija

U većini slučajeva SMA se može odrediti na osnovu pretraživanja delecija u egzonu 7 jer do bolesti najčešće dolazi zbog delecije na oba alela.(7) Ipak postoje slučajevi u kojima postoji delecija u samo jednom alelu, dok se na drugom alelu dogodila druga vrsta mutacije poput: insercija, delecija, *missense* ili besmislenih (prema eng. *nonsense*) mutacija.(22) Zbog male veličine *SMN1* gena lako ga je sekvencirati i pronaći mutaciju u pacijentima koji su negativni na deleciju.(7) Budući da se u nekim slučajevima pojavljuju mutacije koje nisu unutar *SMN1* gena, koristi se masivno paralelno sekvenciranje DNA pomoću kojeg se može, u isto vrijeme, sekvencirati velik broj gena uključenih u neuromišićne poremećaje.(7,23)

Ukoliko se ne pronađe delecija u oba alela *SMN1* gena, potrebno je identificirati mutaciju koja je nastala u jednom od alela.(7) Identifikacija mutacije vrši se na *SMN1* genu pomoću PCR amplifikacije dugih fragmenata nakon čega se vrši direktno DNA sekvenciranje nastalog produkta. PCR amplifikacija dugih fragmenata brza je i efikasna metoda za sekvencioniranje kandidata iz male količine uzorka te se može kombinirati s novijim metodama sekvencioniranja.(24) Sve nove promjene genoma uspoređuju se s genskim varijantama iz baze podataka mutacija ljudskih gena (HGMD, prema eng. *human gene mutation database*).(7) Dodatno se nove mutacije trebaju analizirati pomoću softvera, koji mogu predvidjeti kakav učinak bi nastala mutacija mogla imati na strukturu i funkciju proteina. Također, moguće je testirati i roditelje kako bi se dokazalo postojanje određene mutacije koja se pojavila u potomstvu. U izoliranim populacijama učestalost određene točkaste mutacije može biti visoka zbog pojave mutacije u jednog člana, koja se prenijela na potomstvo i samim

tim, zbog srodstva roditelja, osobe mogu biti homozigoti za određenu točkastu mutaciju.(7)

4.2. Probir novorođenčadi

Budući da osobe kojima je SMA otkrivena u ranoj fazi nastanka bolesti imaju veću šansu za preživljavanje, sporiji razvoj bolesti i bolje šanse za izlječenjem, probir novorođenčadi mogao bi poboljšati trenutne terapijske pokušaje u liječenju SMA.(25) Probir novorođenčadi uključuje testiranja sve novorođenčadi kako bi se otkrile bolesti koje, ako se ne tretiraju, mogu dovesti do ozbiljnih poteškoća ili čak smrti. Kriterije za uključivanje neke bolesti u probir novorođenčadi razvili su Wilson i Junger 1968. godine. Kriteriji su prvo bili većinom ekonomski, dok je danas taj kriterij manje važan.(25) Današnji kriteriji su: stanje mora biti ozbiljan klinički problem, bolest se može otkriti u ranoj dobi iako se još nisu pojavili klinički znakovi bolesti, postoje dovoljno osjetljivi i specifični testovi te postoji značajna klinička dobrobit ukoliko se bolest otkrije na vrijeme.(7)

Budući da SMA nema određen biokemijski marker, a u 95% slučajeva je uzrokovana bilateralnom delecijom egzona 7 *SMN1* gena, bilo je moguće razviti dovoljno specifične testove koji se mogu koristiti u široj populaciji.(7,25) Testovi se provode na DNA prikupljenoj iz osušene krvi pomoću qRT-PCR metode. Pored analize *SMN1* gena potrebno je provesti i evaluaciju broja kopija *SMN2* gena, za što se najčešće koristi MLPA metoda. Utvrđivanje broja kopija *SMN2* gena vrši se kako bi se predvidjeli mogući klinički ishodi te kako bi se odredilo koliko rano je potrebno početi s terapijom. Biogen-ovo kliničko istraživanje NURTURE pokazalo je da terapija nusinersenom unutar prvih šest tjedana pruža puno bolji ishod, nego kada se s terapijom krene kasnije.(7) Probirom novorođenčadi nije moguće potvrditi SMA ukoliko postoji točkasta mutacija u jednom od alela. (25)

Napredak u istraživanju terapija za SMA, potaknuo je raspravu o potrebi uvođenja probira novorođenčadi za dijagnostiku SMA.(25) Prve studije

provedene su u Tajvanu, a zatim i u SAD-u. Trenutno SAD je prva država koja je uvela SMA na popis bolesti za koje se provodi probir novorođenčadi. U Europi, Belgija i Njemačka su prve države koje su uvele probni probir novorođenčadi za SMA. Pokazano je da je SMA u tim državama češća nego što se smatralo te da je njena učestalost zapravo 1:7350 novorođenčadi.(25)

U SAD-u probir novorođenčadi za SMA provodi se od 2018. godine.(4) U nekim europskim državama provode se probna istraživanja dok je u nekim SMA već dodana na popis bolesti za koje se vrši probir novorođenčadi. Plan je do 2025. godine uvesti SMA na popis bolesti u svim europskim državama. (25)

4.3. Testiranje nosilaca

Kvantitativne analize broja kopija *SMN1* gena koriste se kako bi se otkrili nosioci sa samo jednom kopijom *SMN1* gena.(7) Testiranje nosilaca izuzetno je korisno osobama koje imaju povijest SMA u obitelji te su potencijalni nosioci mutacije koja se može prenijeti na potomstvo. Testiranja nosilaca vrše se pomoću qRT-PCR-a i MLPA testova.(3) Ukoliko je osoba nosilac mutacije, preporuča se prenatalno testiranje, *in vitro* fertilizacija te genska testiranja. U većini slučajeva status nosioca otkriva se tek nakon rođenja djeteta koje je naslijedilo bolest. Cilj testiranja nosilaca je informirati osobe bez povijesti bolesti u obitelji o mogućim rizicima. Kriteriji za određivanje potrebe za testiranjem nosilaca su: ozbiljnost bolesti, učestalost bolesti u populaciji, dostupnost pouzdanih testova, mogućnost prenatalne dijagnoze i dostupnost genetskog savjetovanja.(3)

Testiranje nosilaca ima određene nedostatke, poput toga što u nekim slučajevima do mutacija dolazi *de novo*.(7) U općoj populaciji 3-4% osoba imaju dvije kopije *SMN1* gena na jednom kromosomu, dok na drugom nemaju kopije *SMN1* gena. Ovakav genotip označava se kao "2+0". Osobe s ovim genotipom ne razlikuju se od osoba s jednom kopijom na oba

kromosoma. Ovaj genotip učestaliji je u određenim populacijama poput Afroamerikanaca, Aškenazi Židova te Španjolaca. U ovim populacijama teško je pratiti nosioce jer se kod osoba s dvije kopije *SMN1* bolest ne pojavljuje.(7)

Genetsko savjetovanje je važan dio testiranja nosilaca jer upućuje osobe u ograničenja ovog tipa testiranja.(7) Potrebno je objasniti osobama ograničenja poput: dvije kopije na jednom kromosomu, mutacije koje nisu uzrokovane delecijama te *de novo* mutacije koje mogu nastati. Lažno negativni rezultati također se moraju uzeti u obzir prilikom testiranja nosilaca.(3)

5. Terapijski pristupi u liječenju SMA

Nakon otkrića *SMN1* i *SMN2* gena 1995. godine počelo je novo razdoblje u tretiranju SMA. (5) Otkrićem povezanosti između broja kopija *SMN2* gena i težine bolesti dovelo je do zaključka da bi *SMN2* gen mogao umanjiti gubitak *SMN1* gena do određene granice. Ovakva terapija mogla bi povećati količinu SMN proteina pune duljine u zahvaćenim organima i motoričkim neuronima.(5)

Do sada postoje tri lijeka odobrena od američke administracija za hranu i lijekove (FDA prema eng. *Food and Drug Administration*) i europske medicinske agencije (EMA prema eng. *European Medicines Agency*): nusinersen, risdiplam i onasemnogene abeparvovec (OA)(26) Nusinersen i risdiplam vežu se specifično na *SMN2* pre-mRNA kako bi pojačali uključivanje egzona 7 u mRNA te kako bi se dobio SMN protein pune duljine. OA je genska nadomjesna terapija koja pomoću virusnog vektora, koji eksprimira *SMN1*, osigurava dodatne količine normalnog *SMN1*. Uvođenjem probira novorođenčadi i određivanjem broja kopija *SMN2* gena može se uveliko pomoći u samom načinu primjene terapije. Također, pokušava se odrediti i regije *SMN2* gena koje su iste kod svih pacijenata jer bi te regije mogle biti terapijske mete u istraživanju novih lijekova.(26) Budući da se radi o relativno novim lijekovima, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se pokazale dugoročne dobrobiti i posljedice navedenih terapija.(10)

Nakon odobrenja ovih lijekova pokušalo se i s kombiniranom terapijom u kojoj se upotrebljava nusinersen te zatim OA ili obrnuto.(26) Kombinacija također može uključivati i risdiplam. Rezultati su pokazali da mehanizmi djelovanja ovih terapija ne djeluju jedna na drugu, nego djeluju komplementarno. Pacijenti koji primaju gensku terapiju ekspimirat će SMN protein dok se na *SMN2* gen i dalje može djelovati pomoću *SMN2* modulatora. Mehanizam regulacije proizvodnje SMN proteina još uvijek nije poznat. Novija istraživanja na miševima pokazala su da prevelike količine SMN proteina mogu djelovati neurotoksično te se zbog tog treba paziti prilikom kombiniranja navedenih terapija. Zbog ovih rezultata ne preporuča

se kombinacija terapija s genskom terapijom. Ipak, pacijentima se preporuča sekvenciranje *SMN2* gena kako bi se terapija mogla prilagoditi pacijentu te kako bi pacijent imao najbolji mogući klinički ishod.(26)

5.1. Nusinersen: terapija *antisense* oligonukleotidima

Godine 2006. otkriven je intronski element u ljudskim *SMN1* i *SMN2* genima intronski utišivač prekrajanja (ISS-N1 prema eng. *intronic splicing silencer*).⁽²⁷⁾ Ova regija jako je važna jer regulira alternativno prekrajanje *SMN* egzona 7. Nusinersen je antisense oligonukleotid, jednolančana DNA molekula koja ciljano djeluje na regiju unutar egzona 7. Vezanjem na ISS-N1 regiju, nusinersen sprječava vezanje hnRNP, čime dolazi do uključivanja egzona 7 u prekrajanje te nastaje *SMN* protein pune duljine.⁽²⁷⁾ Nusinersen je odobrila FDA 2016. godine, dok ga je EMA odobrila 2017. godine te ga to čini prvim odobrenim lijekom za SMA.⁽¹⁰⁾

5.1.1. Klinička istraživanja

Nusinersen se primjenjuje intratekalno, to jest ubrizgava se direktno u spinalnu tekućinu, kroz dva mjeseca u četiri doze, nakon čega se pacijentima daje po jedna injekcija svaka 4 mjeseca.⁽¹⁰⁾ Lijek se primjenjuje intratekalno zbog njegove nemogućnosti da prođe krvno-moždanu barijeru.⁽⁵⁾ Faza 1 kliničkih studija, koja je uključivala 28 pacijenata sa SMA tipovima 2 i 3 od 2 do 14 godina, pokazala je sigurnost i toleranciju bez ozbiljnih posljedica.⁽⁷⁾ Rezultati su pokazali povišenu koncentraciju *SMN* proteina u likvoru te su pacijenti s višim dozama pokazali poboljšanje motoričkih funkcija. Faza 2 kliničkih istraživanja uključivala je 20 pacijenata sa SMA tipom 1 u dobi od 3 tjedna do 7 mjeseci i pokazala je slične podatke o sigurnosti, toleranciji i efikasnosti, uz poboljšanje motoričkih funkcija i povećanje šansi za preživljavanje i smanjenje potrebe za uporabom mehaničke ventilacije. Nakon ovih istraživanja, započela su dva velika istraživanja faze 3: ENDEAR na pacijentima sa SMA tip 1, koje uključuje 122 pacijenta starosti do 7 mjeseci, i CHERISH na pacijentima sa SMA tip 2, koje uključuje 126 pacijenata dobi od 2 do 9 godina⁽⁵⁾. Dosad su ova istraživanja pokazala značajna

poboljšanja u motoričkim funkcijama te je stopa preživljavanja veća. Veća dobrobit nusinersena vidljiva je u novorođenčadi koja su ranije krenula s liječenjem. Još jedno istraživanje NURTURE u fazi 2 proučava optimalno vrijeme kada bi se trebalo početi s terapijom nusinersenom. U ovom istraživanju sudjeluje 25 pacijenata koji su liječeni presimptomatski te imaju dvije ili tri kopije *SMN2* gena. Dosadašnji rezultati pokazali su da su sva djeca živa, bez potrebe za mehaničkom ventilacijom te mogu sjediti samostalno. Trenutno se provodi i SHINE istraživanje, koje uključuje pacijente iz ENDEAR istraživanja, te se proučavaju dugotrajni učinci terapije nusinersenom. SHINE istraživanje pokazalo je da je nusinersen siguran i da je najučinkovitiji ako se s terapijom krene ranije.(7)

5.1.2. Mehanizam djelovanja

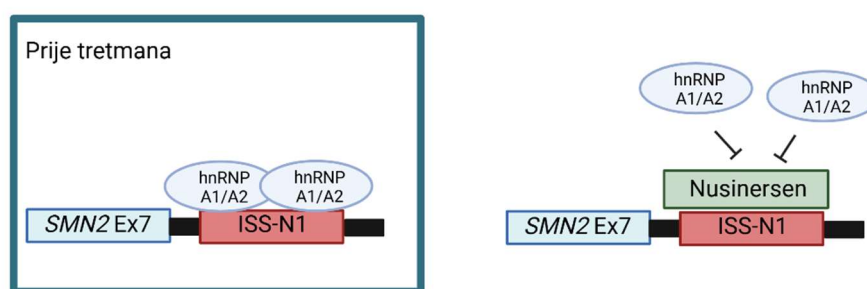
Terapija oligonukleotidima ima svoje brojne prednosti.(27) Oligonukleotidi su visoko specifični za svoju ciljnu sekvencu, što smanjuje rizik od neselektivnog vezanja za druge slične sekvence. Imaju nisku toksičnost i dug poluživot.(8) Oligonukleotidi na različite načine mogu utjecati na gene važne za nastanak bolesti. Neki od mehanizama djelovanja su: pojačavanje ekspresije određenog gena, ispravljanje mutacija u genu i uređivanje prekrajanja. Oligonukleotidi su sigurniji za uporabu u odnosu na druge genske terapije jer su njihovi učinci reverzibilni.(27)

Iako intratekalna i intracerebroventrikularna administracija oligonukleotida mogu pomoći u njihovoj distribuciji do središnjeg živčanog sustava, ove metode su invazivne i predstavljaju veliki teret za pacijente.(20,27) Kako bi se dostigao njihov prijenos preko krvno-moždane barijere te kako bi se ostvarila oralna ili intranazalna administracija potrebno je razviti kemijske modifikacije koje bi to učinile mogućim.(27)

Kako bi se razvili oligonukleotidni lijekovi bilo je potrebno izvršiti supstituciju jednog od kisika unutar fosfatne skupine sumporom, kako bi se dobila željena struktura fosfonotioatne okosnice.(27) Na ovaj se način povećala otpornost na nukleaze i sposobnost vezanja na proteinske nosače

u krvi, čime se povećala apsorpcija, produljio se životni vijek i usporilo se izlučivanje putem bubrega. Dodatnim modifikacijama šećerne skupine povećao se afinitet oligonukleotida za DNA i biodostupnost te se smanjila toksičnost i imunostimulatorni učinci.(27)

ISS-N1 regija *SMN2* gena sastoji se od 15 nukleotida na koje se vežu hnRNP.(27) Unutar prvih šest nukleotida *SMN2* gena nalazi se regija za vezanje hnRNP A1, dok se na ostatak veže hnRNP A2. Vezanjem hnRNP na ove regije *SMN2* gena dolazi do prekrajanja egzona 7 i nastanka nepotpune mRNA koja dovodi do nastanka nepotpunog SMN proteina. Nusinersen djeluje tako što sprječava vezanje hnRNP A1/A2 molekula na ISS-N1 regiju introna 7 čime se sprječava izrezivanje egzona 7 te nastaje funkcionalan SMN protein.(5)



Slika 5: Mehanizam djelovanja nusinersena. Vezanjem nusinersena na ISS-N1 regiju, onemogućava se vezanja hnRNP A1/A2 za ovu regiju te ne dolazi do izrezivanja egzona 7 SMN proteina, što dovodi do nastanka funkcionalnog proteina. Preuzeto i modificirano iz (5) Kreirano uz pomoć Biorender-a

5.2. Onasemnogene abeparvovec (OA): genska terapija za SMA

Onasemnogene abeparvovec (OA) je genska terapija za SMA koja omogućuje ekspresiju funkcionalnog SMN proteina unutar stanica.(10) Unos gena posredovan je pomoću adeno-združenog virusnog vektora serotipa 9 (AAV-9) uz pojačivač iz citomegalovirusa i promotor β -aktina iz pilića.(7) OA je odobrila FDA 2019. godine za tretiranje djece mlađe od

dvije godine, dok je EMA terapiju odobrila 2020. godine.(4) Terapija se administrira u jednoj intravenskoj dozi. Intratekalna primjena na svinjama pokazala je da se na ovaj način može povećati ekspresija *SMN1* gena uz upotrebu manjih doza.(10)

5.2.1. Klinička istraživanja

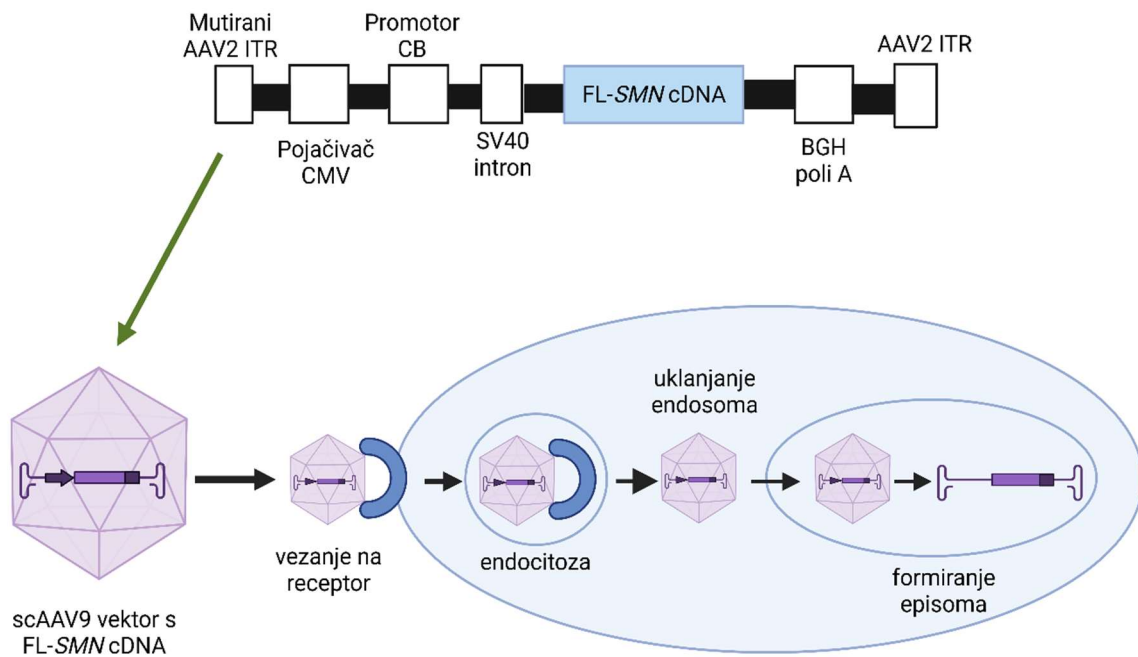
Kliničko istraživanje START u fazi 1 tretiralo je 15 novorođenčadi sa SMA tip 1 uz različite doze genske terapije.(7) Cilj istraživanja bio je pratiti sigurnost, neželjene efekte te vrijeme do mehaničke ventilacije i smrti pacijenata. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije skupine. Jedna skupina tretirana je s nižom dozom, dok je druga tretirana s višom dozom lijeka. U skupini s nižom dozom bila su 3 pacijenta a u drugoj skupini 12 pacijenata.(5) Svi pacijenti su do 20. mjeseca bili živi bez potrebe za mehaničkom ventilacijom te se pokazao napredak u motoričkim funkcijama. Dugoročno je ovo istraživanje pokazalo bolji ishod kod pacijenata u kojih se s terapijom krenulo ranije.(10) Nakon 24 mjeseca jedan od pacijenata iz skupine tretirane nižom dozom morao je biti priključen na mehaničku ventilaciju. Pacijenti iz skupine s nižom dozom nisu ostvarili mogućnost samostalnog sjedenja. Devet pacijenata iz skupine tretirane višom dozom mogli su samostalno sjediti dok je dvoje od njih moglo samostalno stojati i hodati.(7)

Sigurnost i efikasnost terapije dokazani su kroz dva klinička istraživanja faze 3 u Europi i SAD-u, u 22 djece starosti do 7 mjeseci.(10) Pacijenti su praćeni 18 mjeseci nakon primjene doze. Od 22 pacijenata njih 13 je moglo sjediti samostalno, te ih je 20 bilo živo bez potrebe za mehaničkom ventilacijom. Ozbiljni neželjeni učinci uključivali su bronhiolitis, pneumoniju i poteškoće u disanju . Smatra se da su ovi učinci povezani s terapijom. Unatoč ovim podacima lijek se smatra sigurnim i efikasnim za tretiranje SMA.(10) Najčešći prijavljeni neželjeni učinak je smanjena koncentracija trombocita i povišena razina serumskih aminotransferaza.(1)

Za odrasle pacijente OA nije testiran zbog visoke doze virusa koji bi se trebao unijeti u organizam te stvorenih protutijela uslijed prethodne izloženosti adenovirusima.(10) Problemi poput imunosnog odgovora na adenovirusnu kapsidu, neurotoksičnosti i hepatotoksičnosti dovode u pitanje korištenje ovog tipa terapije u odraslih. Ipak novija istraživanja pokazala su da nema povišene koncentracije protutijela na adenovirusnu kapsidu u serumu, što otvara mogućnost razvoja terapije i za odrasle pacijente.(10)

5.2.2. Mehanizam djelovanja

Genska terapija je oblik liječenja kojim se u organizam unose geni kako bi se ispravila ili nadomjestila funkcija koja je poremećena zbog genske mutacije, koja uzrokuje bolest.(28) Genske terapije općenito uključuju: zamjenu, utišavanje, izrezivanje mutiranog gena ili uvode novi gen koji vraća određenu funkciju. OA je lijek koji se temelji na AAV-9 vektoru koji prelazi krvno-moždanu barijeru.(5) Za ovu terapiju koristi se rekombinantna adenovirusna kapsida unutar koje je integriran *SMN1* gen. Uloga kapside je ta da pređe staničnu membranu odakle se DNA koju prenosi može translocirati u jezgru stanice, gdje će se prepisati u RNA.(29) Nakon ulaska u stanicu, vektor se prenosi u jezgru gdje se ponaša kao episom, mali, stabilni kromosom koji se ne integrira u genom domaćina. Kako bi se povećala genska ekspresija, AAV-9 u sebi sadrži dvolančanu DNA, jer je mogućnost ekspresije gena s jednolančane DNA manja. Kako bi se dobila dvolančana DNA, potrebno je izmijeniti jedan od dva inverzna terminalna ponavljanja (ITR). Distribucijom dvolančane DNA dolazi do bržeg početka transkripcije.(28) Ukoliko bi se koristila jednolančana DNA, prvo bi se morala sintetizirati dvolančana DNA u stanici, kako bi se gen eksprimirao. Hibridni pojačivač citomegalovirusa i promotor β -aktina pilića koriste se kako bi se aktivirala transkripcija te kako bi došlo do ekspresije SMN proteina.(5)



Slika 6: Mehanizam djelovanja OA. OA koristi AAV-9 vektor za prijenos SMN1 gena kroz krvno-moždanu barijeru u jezgru stanice, gdje se dvolančana DNA episomalno eksprimira, potičući transkripciju SMN proteina uz pomoć pojačivača CMV i CB promotora. Preuzeto i modificirano iz (5) Kreirano uz pomoć Biorender-a

5.3. Risdiplam

Risdiplam je mala molekula, koja se primjenjuje oralno i djeluje kao modifikator prekrajanja *SMN2* gena, čime se povećava proizvodnja funkcionalnog SMN proteina.(6) Risdiplam je odobrila FDA 2020. godine, dok je EMA lijek odobrila 2021. godine.(5) Iako je lijek prvo odobren za tretiranje pacijenata starijih od dva mjeseca, risdiplam je u SAD-u trenutno odobren za sve dobne skupine. Risdiplam kao i OA ima mogućnost prolaska krvno-moždane barijere.(10)

Velika prednost risdiplama je njegova oralna primjena.(5) Lijek se administrira jednom dnevno, a doza se računa na osnovu dobi i mase pacijenta. Odrasli i djeca iznad dvije godine koji teže više od 20 kg, koriste dozu od 5 mg na dan. Za djecu ispod dvije godine doza se računa prema masi djeteta, u većini slučajeva iznosi 0.25 mg/kg na dan.(5)

5.3.1. Klinička istraživanja

Nakon provedenih kliničkih istraživanja faze 1, pokrenuta su dva velika istraživanja u pacijenata s ranom i kasnom SMA.(1) FIREFISH istraživanje provelo se na 21 novorođenčetu s SMA tipom 1.(5) Učesnici su bili podijeljeni u dvije skupine, jedna s nižom dozom lijeka od 0.08 mg/kg na dan 12 mjeseci i druga skupina s višom dozom lijeka od 0.2 mg/kg na dan 12 mjeseci. U skupini s nižom dozom bilo je 4 djece, a u skupini s višom dozom 17 djece.(4) Ukupno 7 djece u skupini s višom dozom i nijedno dijete u skupini s nižom dozom ostvarili su mogućnost samostalnog sjedenja te je viša doza odabrana za drugi dio istraživanja.(5)

Drugi dio istraživanja uključivo je 41 dijete starosti od jednog do sedam mjeseci koja su dijagnosticirana sa SMA(5) Glavni cilj bio je ostvarivanje samostalnog sjedenja nakon 12 mjeseci, što je uspjelo 12 djece. Nakon 24 mjeseca terapije, 18 djece uspjelo je ostvariti samostalno sjedenje, ali nijedno od njih nije uspjelo ostvariti samostalno stojanje.(5)

Drugo istraživanje SUNFISH za cilj je imalo testirati sigurnost, toleranciju, farmakokinetiku, farmakodinamiku i efikasnost risdiplama.(20) Učesnici su bili starosti od dvije do 25 godina i dijagnosticirani sa SMA tip 2 ili 3.(1) Prvi dio istraživanja uključivao je 51 pacijenta te se provelo kako bi se utvrdila doza za uporabu u drugom dijelu istraživanja.(5) Glavni cilj prvog dijela istraživanja bio je pratiti promjenu u mjerama motoričkih funkcija (MFM, prema eng. *motor function measure*) nakon 12 mjeseci tretmana.

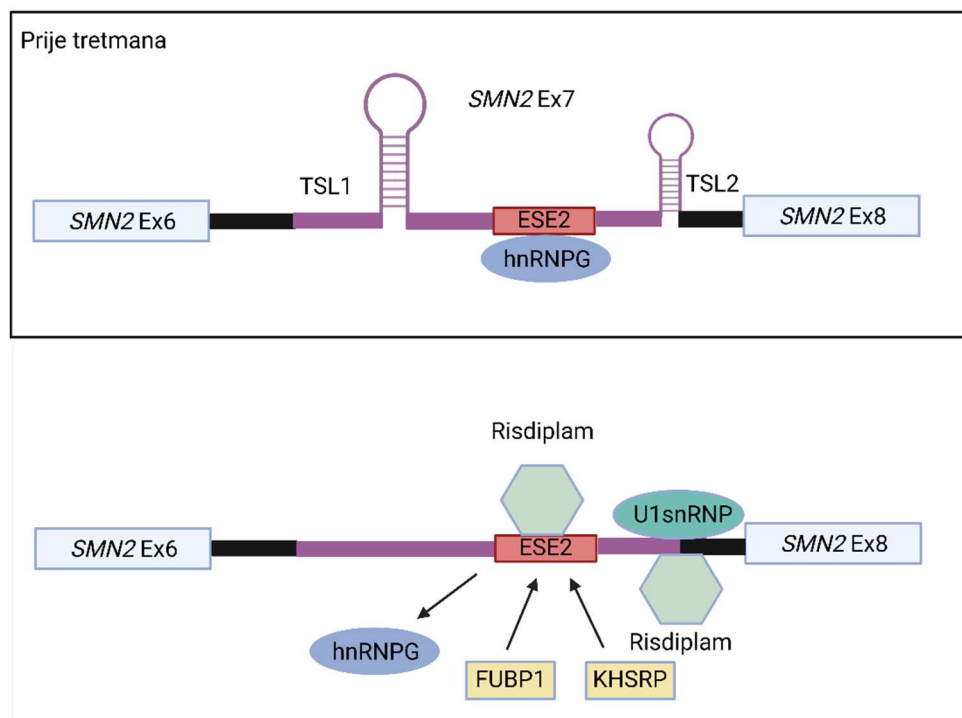
U drugom dijelu istraživanja pacijenti su bili podijeljeni u dvije skupine koje su dnevno oralno primjenjivale risdiplam ili placebo.(5) Nakon godinu dana, pacijenti koji su uzimali višu dozu risdiplama pokazali su poboljšanje u odnosu na one koji su uzimali placebo. Druga godina istraživanja potvrdila je sigurnosni profil risdiplama. Primjena risdiplama kroz 24 mjeseca pokazala je dodatna poboljšanja motoričkih funkcija, što je dokazalo dugoročnu dobrobit terapije.(5)

5.3.2. Mehanizam djelovanja

Risdiplam je lijek koji djeluje u jezgri kao regulator prekrajanja *SMN2* gena.(5) Točan mehanizam kojim risdiplam djeluje na uključivanje egzona 7 u prekrajanju nije točno određen.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da risdiplam može djelovati na dvije regije *SMN2* egzona 7.(5) Egzon 7 ima dvije regije koje su u strukturi ukosnice: terminalna ukosnica 1 (TSL1, prema eng. *terminal stem-loop 1*) u blizini 3' - mjesta prekrajana te terminalna ukosnica 2 (TSL2, prema eng. *terminal stem-loop 2*) u blizini 5' - mjesta prekrajanja.(30)

Risdiplam se može vezati na TSL2 čime se stabilizira dvostruka uzvojnica 5' mjesta prekrajanja i U1 snRNP RNA sekvence čime se potiče inicijacija prekrajanja.(5) Drugo područje je unutarnja struktura u blizini egzonskog pojačivača prekrajanja 2 (ESE2, prema eng. *exonic splicing enhancer 2*). Risdiplam se veže na ESE2 područje i inhibira vezanje hnRNPG proteina te potiče vezanje regulatora prekrajanja čime se potiče uključivanje egzona 7 u prekrajanje.(5,30)



Slika 7: Mehanizam djelovanja risdiplama Risdiplam stabilizira 5' mjesto prekrajanja SMN2 egzona 7 vezanjem na TSL2, te inhibira vezanje hnRNPG na ESE2, potičući tako uključivanje egzona 7 u prekrajanje i stvaranje funkcionalnog SMN proteina. Preuzeto i modificirano iz (5) Kreirano uz pomoć Biorender-a

6. Zaključak

Spinalna mišićna atrofija teška je neurodegenerativna bolest koja uzrokuje slabljenje i atrofiju mišića zbog odumiranja motoričkih neurona u leđnoj moždini i moždanom deblu. Do odumiranja motoričkih neurona dolazi zbog nedostatka funkcionalnog SMN proteina. Ovaj protein je ključan za preživljavanje motoričkih neurona. Mutacije u *SMN1* genu koji kodira SMN protein glavni su uzrok nastanka SMA. Prisutnost *SMN2* gena koji u 5-10% daje funkcionalan protein može ublažiti simptome bolesti, ovisno o broju njegovih kopija.

Mutacije poput delecije egzona 7 i točkastih mutacija u *SMN1* genu dovode do smanjene ekspresije funkcionalnog SMN proteina čime dolazi do smanjene stabilnosti i transporta mRNA molekula u neuronima, čime dolazi do nepravilnog razvitka aksona i neuromišićnih spojnica, što dovodi do gubitka motoričkih funkcija u oboljelih.

Dijagnostičke metode u zadnjih nekoliko godina su jako napredovale. Zahvaljujući metodama poput PCR-a i sekvencioniranja moguće je otkriti na točno kojem dijelu gena se dogodila mutacija te koji je broj kopija *SMN2* gena. Na osnovu ovih podataka mogu se poduzeti potrebne mjere kako bi se bolest tretirala na vrijeme. Uvođenje SMA na popis bolesti koje se testiraju probirom novorođenčadi, pomaže u ranom postavljanju dijagnoze čime se pacijenti mogu liječiti i prije nego se pojave prvi simptomi, što povećava šansu za preživljanje.

Novi terapijski pristupi poput: nusinersena, onasemnogene abeparvoveca i risdiplama predstavljaju revoluciju u liječenju SMA. Nusinersen i risdiplam djeluju na povećanje ekspresije funkcionalnog SMN proteina iz *SMN2* gena, dok onasemnogene abeparvovec dostavlja zdravi *SMN1* gen pomoću AAV9 vektora. Ovi tretmani značajno poboljšavaju kvalitetu života oboljelih, ali je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se odredila dugoročna učinkovitost navedenih terapija.

Napredak u razumijevanju molekularnih mehanizama, dijagnostici i terapiji SMA predstavlja iskorak u medicini, što daje nadu za poboljšanje života oboljelih. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razvile učinkovitije dijagnostičke metode i terapije.

7. Literatura

1. Antonaci L, Pera MC, Mercuri E. New therapies for spinal muscular atrophy: where we stand and what is next. Vol. 182, European Journal of Pediatrics. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 2935–42.
2. Zayia LC TP. StatPearls [Internet] [Internet]. 2024 Jan-. 2023 [cited 2023 Dec 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554616/>
3. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. Vol. 6, Orphanet Journal of Rare Diseases. 2011.
4. Day JW, Howell K, Place A, Long K, Rossello J, Kertesz N, et al. Advances and limitations for the treatment of spinal muscular atrophy. Vol. 22, BMC Pediatrics. BioMed Central Ltd; 2022.
5. Nishio H, Niba ETE, Saito T, Okamoto K, Takeshima Y, Awano H. Spinal Muscular Atrophy: The Past, Present, and Future of Diagnosis and Treatment. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
6. Cornell N, Childs AM, Wraige E, Munot P, Ambegaonkar G, Chow G, et al. Risdiplam in Spinal Muscular Atrophy: Safety Profile and Use Through The Early Access to Medicine Scheme for the Paediatric Cohort in Great Britain. J Neuromuscul Dis. 2024 Mar 5;11(2):361–8.
7. Keinath MC, Prior DE, Prior TW. Spinal muscular atrophy: Mutations, testing, and clinical relevance. Vol. 14, Application of Clinical Genetics. Dove Medical Press Ltd; 2021. p. 11–25.
8. Tisdale S, Pellizzoni L. Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. Journal of Neuroscience. 2015;35(23):8691–700.

9. OpenStax College, Anatomy and Physiology. OpenStax CNX.
10. Aasdev A, Sreelekshmi RS, Iyer VR, Moharir SC. Spinal muscular atrophy: Molecular mechanism of pathogenesis, diagnosis, therapeutics, and clinical trials in the Indian context. Vol. 49, *Journal of Biosciences*. Springer; 2024.
11. Chaytow H, Huang YT, Gillingwater TH, Faller KME. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. Vol. 75, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2018. p. 3877–94.
12. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. Vol. 33, *Neurologic Clinics*. W.B. Saunders; 2015. p. 831–46.
13. Faravelli I, Riboldi GM, Rinchetti P, Lotti F. The SMN Complex at the Crossroad between RNA Metabolism and Neurodegeneration. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
14. Singh RN, Howell MD, Ottesen EW, Singh NN. Diverse role of survival motor neuron protein. Vol. 1860, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V.; 2017. p. 299–315.
15. Pánek J, Roithová A, Radivojević N, Sýkora M, Prusty AB, Huston N, et al. The SMN complex drives structural changes in human snRNAs to enable snRNP assembly. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).
16. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. p. 108–21.
17. Li L, Yu J, Ji SJ. Axonal mRNA localization and translation: local events with broad roles. Vol. 78, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 7379–95.

18. Burghes AHM, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: Why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? Vol. 10, *Nature Reviews Neuroscience*. 2009. p. 597–609.
19. Rashid S, Dimitriadi M. Autophagy in spinal muscular atrophy: from pathogenic mechanisms to therapeutic approaches. Vol. 17, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media SA; 2023.
20. Aslesh T, Yokota T. Restoring SMN Expression: An Overview of the Therapeutic Developments for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Cells*. 2022 Feb 1;11(3).
21. Fu X, Shi Y, Ma J, Zhang K, Wang G, Li G, et al. Advances of multiplex ligation-dependent probe amplification technology in molecular diagnostics. Vol. 73, *BioTechniques*. Future Science Ltd; 2022. p. 205–13.
22. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve*. 2015 Feb 1;51(2):157–67.
23. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. Vol. 85, *American Journal of Human Genetics*. 2009. p. 142–54.
24. Jia H, Guo Y, Zhao W, Wang K. Long-range PCR in next-generation sequencing: Comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Sci Rep*. 2014 Jul 18;4.
25. Jędrzejowska M. <p>Advances in Newborn Screening and Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy</p>. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2020 Dec;Volume 10:39–47.
26. Costa-Roger M, Blasco-Pérez L, Cuscó I, Tizzano EF. The importance of digging into the genetics of SMN genes in the therapeutic scenario of spinal muscular atrophy. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.

27. Li Q. Nusinersen as a therapeutic agent for spinal muscular atrophy. Vol. 61, Yonsei Medical Journal. Yonsei University College of Medicine; 2020. p. 273–83.
28. Ogbonmide T, Rathore R, Rangrej SB, Hutchinson S, Lewis M, Ojilere S, et al. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Apeparvovec (Zolgensma). Cureus. 2023 Mar 15;
29. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. Vol. 31, BioDrugs. Springer International Publishing; 2017. p. 317–34.
30. Ratni H, Scalco RS, Stephan AH. Risdiplam, the First Approved Small Molecule Splicing Modifier Drug as a Blueprint for Future Transformative Medicines. ACS Med Chem Lett. 2021 Jun 10;12(6):874–7.

**Dario Brzić****Datum rođenja:** 17/07/2002 | **Državljanstvo:** hrvatsko, bosansko-hercegovačko | **Spol:** Muško | **Telefonski broj:**(+385) 976059808 (Mobilni telefon) | **E-adresa:** dariobrzić6@icloud.com |**Adresa:** Srebrenička 5/6, 70101, Jajce, Bosna i Hercegovina (Kućna)● **OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE**

2021 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

SVEUČILIŠNI PRVOSTUPNIK BIOTEHNOLOGIJE I ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA Fakultet biotehnologije i razvoja lijekovaInternetske stranice <https://biotech.uniri.hr/>

2017 – 2021 Visoko, Bosna i Hercegovina

FRANJEVAČKA KLASIČNA GIMNAZIJA● **RADNO ISKUSTVO**

2024 Rijeka, Hrvatska

DEMONSTRATOR NA KOLEGIJU OPĆA KEMIJA FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

2023 Zagreb, Hrvatska

STRUČNA PRAKSA INSTITUT ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA I MEDICINU RADA● **JEZIČNE VJEŠTINE**Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C1	C1	C1	C1	C1
NJEMAČKI	A2	A2	A2	A2	A2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik● **DRUŠTVENE I POLITIČKE AKTIVNOSTI**

2023 – TRENUTAČNO Rijeka

Tajnik studentskog zbora Fakulteta biotehnologije i razvoja lijekova

2023 – TRENUTAČNO Rijeka

Predstavnik studenata u Vijeću Fakulteta biotehnologije i razvoja lijekova

2022 – TRENUTAČNO Rijeka

Član studentskog zbora Fakulteta biotehnologije i razvoja lijekova

2022 – TRENUTAČNO Rijeka

Predstavnik studenata u Povjerenstvu za priznavanje izvannastavnih aktivnosti

- **MREŽE I ČLANSTVA**

2021 – TRENUTAČNO Rijeka

Udruga studenata biotehnologije Rijeka (USBRI)

- **KONFERENCIJE I SEMINARI**

2024 Rijeka

Konferencija "Budućnost i perspektiva"

- **DIGITALNE VJEŠTINE**

Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Access, Outlook, itd.) | Poznavanje programa za računalnu kemiju (PyMOL, Avogadro, VDM, Gamess) | Društvene mreže (Facebook, Instagram, Youtube, Viber, WhatsApp, TikTok)