

Analiza laboratorijskih parametara u oboljelih od amiotrofične lateralne skleroze u KBC Split u petogodišnjem razdoblju

Macan, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:174219>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ēma Macan

**ANALIZA LABORATORIJSKIH PARAMETARA U OBOLJELIH OD
AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE U KBC SPLIT
U PETOGODIŠNJEM RAZDOBLJU**

Diplomski rad

Akadska godina:

2022./2023.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. prim. Ivica Bilić

Split, srpanj 2023.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Primarne bolesti motoričkih neurona..... | 2 |
| 1.2. Epidemiologija ALS-a..... | 3 |
| 1.3. Etiopatogeneza ALS-a..... | 5 |
| 1.3.1. Genetski čimbenici ALS-a..... | 5 |
| 1.3.2. Okolišni čimbenici ALS-a..... | 8 |
| 1.3.3. Potencijalni patomehanizmi ALS-a..... | 9 |
| 1.4. Patohistološka obilježja ALS-a..... | 12 |
| 1.4.1. Patohistološke promjene..... | 12 |
| 1.4.2. Neuroanatomska propagacija ALS-a..... | 13 |
| 1.5. Klinička slika ALS-a..... | 14 |
| 1.5.1. Kliničke varijante ALS-a..... | 14 |
| 1.5.2. Simptomi ALS-a..... | 16 |
| 1.6. Dijagnostika ALS-a..... | 17 |
| 1.6.1. Dijagnostički algoritam ALS-a..... | 17 |
| 1.6.2. Diferencijalna dijagnoza ALS-a..... | 18 |
| 1.6.3. Ljestvica funkcionalne ocjene ALS-a..... | 20 |
| 1.7. Liječenje ALS-a..... | 20 |
| 1.7.1. Dostupna farmakoterapija za liječenje ALS-a..... | 20 |
| 1.7.2. Lijekovi koji modificiraju tijek bolesti..... | 21 |
| 1.7.3. Simptomatsko liječenje ALS-a..... | 22 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 23 |
| 2.1. Cilj istraživanja..... | 24 |
| 2.2. Hipoteze..... | 24 |
| 3. ISPITANICI I POSTUPCI..... | 25 |
| 3.1. Ispitanici..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Ustroj istraživanja | 26 |
| 3.3. Etička načela | 26 |
| 3.4. Postupci istraživanja | 26 |
| 3.5. Statističke metode | 26 |
| 4. REZULTATI | 28 |
| 4.1. Rezultati analize laboratorijskih parametara | 32 |
| 5. RASPRAVA | 38 |
| 6. ZAKLJUČCI | 42 |
| 7. LITERATURA | 44 |
| 8. SAŽETAK | 51 |
| 9. SUMMARY | 54 |

*Zahvaljujem u prvom redu svojem mentoru, izv. prof. dr. sc. prim. Ivici Biliću,
na vodstvu, trudu, pruženom znanju i svim savjetima
koji su doprinijeli pri stvaranju ovoga rada.*

*Hvala mojim dragim prijateljima i kolegama,
s kojima je studentski život brzo proletio u konstantnom hrabrenju i podršci, ali i zabavi,
jer kako bi jedan kolega rekao "leti vrijeme kad se dobro zabavljaš",
s kojima sam imala sreću znati da smo skupa izgradili mnogo uspomena,
a nove tek dolaze.*

*Svojoj obitelji i zaručniku, sada i mužu, zahvaljujem na velikoj podršci i razumijevanju,
a iznad svega,*

*beskrajno se zahvaljujem mojim nesebičnim obožavateljima:
mojim roditeljima,
bez kojih ni jedno postignuće u životu ne bi bilo moguće,
koji su mi uvijek bili oslonac i koji su mi zajedno, ali i svako na svoj način,
beuvjetno pružili sve na svijetu,
a i mnogo više.*

POPIS KRATICA

SŽS – središnji živčani sustav

DMN – donji motorički neuron

GMN – gornji motorički neuron

BMN – bolest motoričkih neurona

PBP – progresivna bulbarna paraliza

PLS – primarna lateralna skleroza

PMA – progresivna mišićna atrofija

SMA – spinalna mišićna atrofija

ALS – amiotrofična lateralna skleroza

sALS – sporadični oblik amiotrofične lateralne skleroze (engl. *sporadic ALS*)

fALS – familijarni oblik amiotrofične lateralne skleroze (engl. *familial ALS*)

ALS-FTD – amiotrofična lateralna skleroza s frontotemporalnom demencijom

SOD1 – gen za bakar/cink superoksid-dismutazu 1

C9orf72 – gen C9orf72 (engl. *chromosome 9 open reading frame 72*)

TDP43/TARDP – gen TARDP (engl. *transactive response DNA binding*)

FUS – gen FUS (engl. *fused in sarcoma*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

TDP-43 – TAR DNA-vezujući protein

RBP – RNA-vezujući protein (engl. *RNA binding protein*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

EMG - elektromiografija

MR – magnetska rezonanca

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

ALSFERS – ljestvica funkcionalne ocjene amiotrofične lateralne skleroze (engl. *ALS functional rating scale*)

ALSFERS-R – revidirana verzija ALSFRS

NIV – neinvazivna mehanička ventilacija

PEG – perkutana endoskopska gastrostoma

CRP – C reaktivni protein

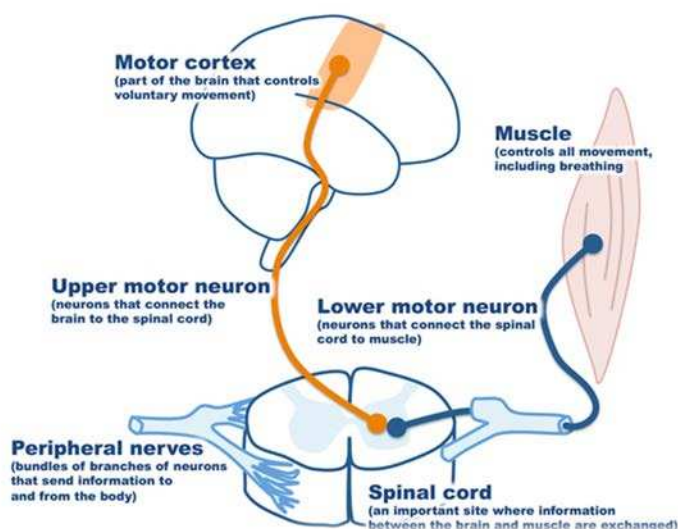
KBC – klinički bolnički centar

1. UVOD

1.1. Primarne bolesti motoričkih neurona

Motorički neuroni su stanice središnjeg živčanog sustava (SŽS), građene od tijela neurona, dendrita i dugačkog aksona zaduženog za prenošenje živčanih signala. Nalaze se u mozgu i leđnoj moždini te su odgovorni za rad i koordinaciju svih motoričkih funkcija (1). SŽS sastoji se od nekoliko dijelova zaduženih za obavljanje motoričkih aktivnosti. U odvijanje motorike uključeni su piramidni i ekstrapiramidni živčani putovi, mali mozak te motorički neuroni moždanog debla i leđne moždine koji čine donji motorički neuron (DMN). vlakna piramidnog puta, to jest vlakna gornjeg motoričkog neurona (GMN), potječu iz motoričkih centara cerebralnog korteksa i odgovorna su za voljnu motoriku. Spuštaju se kroz bijelu tvar SŽS-a kortikobulbarnim putovima tvoreći sinapse s DMN-om unutar motoričkih jezgara kranijalnih živaca u moždanom deblu. Kortikospinalnim putovima GMN tvori sinapse s DMN-om unutar prednjih rogova leđne moždine. Ostali utjecaji na DMN pripadaju ekstrapiramidnom putu čija vlakna potječu iz bazalnih ganglija i malog mozga, a funkcija im je regulacija i modulacija tonusa, refleksa te koordinacija pokreta. Donji motorički neuroni nastavljaju se u obliku kranijalnih i perifernih živaca, a završavaju u obliku neuromuskularnih spojeva na ciljnim mišićnim skupinama koje inerviraju (Slika 1) (2,3).

In **Motor Neuron Disease** connections from the brain to the spinal cord (**upper motor neurons**) and from the spinal cord to the muscle (**lower motor neurons**) may die. As these neurons die, control of **muscles** are lost.



Slika 1. Shema anatomije motoričkih neurona
(preuzeto s: <https://www.mndandme.com.au/what-is-mnd/what-is-mnd/>)

Bolesti motoričkih neurona (BMN) zajednički je naziv za grupu progresivnih neuroloških bolesti, kojima se u pozadini nalazi degeneracija tijela motoričkih stanica – motoneurona u korteksu mozga, moždanom deblu i prednjim rogovima leđne moždine (4). Iako točan mehanizam nastanka ovakvog oštećenja nije u potpunosti jasan, smatra se da se u pozadini mogu nalaziti brojni uzroci. Na razvoj bolesti utječu genetska predispozicija, okolišni čimbenici, poremećaji na razini imunološkog sustava te infektivni agensi (5). Mogući mehanizmi koji se smatraju odgovornima za nastanak bolesti ove skupine su poremećaji na razini bioloških zaštitnih i metaboličkih mehanizama, poput ekscitotoksičnosti, oksidacijskog stresa, agregacije abnormalnih proteina i gušenja aksonskog transporta proteinskim agregatima ili mutiranim neurofilamentnim proteinima (4). Obzirom na predominantno zahvaćenu muskulaturu (muskulatura udova ili bulbarna muskulatura) te prirodu klinički uočenih motornih deficita (zahvaćenost GMN-a ili DMN-a), primarne BMN mogu se podijeliti u pet varijanti. Tu spadaju progresivna bulbarna paraliza (PBP), primarna lateralna skleroza (PLS), progresivna mišićna atrofija (PMA), spinalna mišićna atrofija (SMA), dok je najčešća amiotrofična lateralna skleroza (4,5).

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) kronična je, neurodegenerativna bolest koju karakterizira vrlo heterogeni fenotip. Širok je raspon simptoma početka bolesti i dobi u kojoj se javlja bolest. Uz varijabilni klinički razvoj i neizvjesnu prognozu, glavno obilježje ALS-a je progresivna slabost i atrofija voljne muskulature. Nastaje kao posljedica propadanja GMN i DMN, a upravo iz ravnoteže simptoma oštećenja istih, proizlazi i izrazito heterogena klinička slika koja se razlikuje od bolesnika do bolesnika. Samim time otežano je pravovremeno dijagnosticiranje ALS-a. Na razini neurona dolazi do nuklearne atrofije i degeneracije piramidalnih puteva koja, u konačnici, dovodi do fatalnog ishoda, primarno kao posljedica respiratorne insuficijencije (6,7)

1.2. Epidemiologija ALS-a

Amiotrofična lateralna skleroza najčešća je stečena, neurodegenerativna bolest motoričkog sustava SŽS-a u odrasloj dobi s incidencijom i prevalencijom u globalnom porastu (5,8).

Procijenjena globalna stopa incidencija prema najnovijim podacima je 0,6-3,8 na 100 000 stanovnika, dok Europa bilježi još veću incidenciju 2,1-3,8 na 100 000 stanovnika (8).

U Hrvatskoj ne postoji nacionalni registar za incidenciju ALS-a. Prema podacima Hrvatskog referentnog centra za neuromuskularne bolesti, u Republici Hrvatskoj broj novodijagnosticiranih bolesnika varira od 20 do 30 godišnje (9).

Procijenjena stopa prevalencije, prema najnovijim podacima, na globalnoj razini je 4,1-8,4 na 100 000 stanovnika (8). Obzirom na činjenicu da je očekivani životni vijek nakon dijagnoze 3–5 godina, prevalencija je u konačnici znatno niža nego što se očekuje uzimajući u obzir incidenciju bolesti (5).

Muški spol obolijeva češće nego ženski spol (1,5:1) te se muški spol smatra i čimbenikom rizika. Razlika u omjeru objašnjava se zaštitnom ulogom ženskih hormona te manjoj izloženosti fizičkim poslovima (7). Međutim, novija istraživanja pokazuju izjednačenje omjera incidencije među spolovima, a objašnjava se činjenicom da su žene danas više izložene potencijalnim čimbenicima rizika za ALS, poput pušenja (8,10) i profesionalnih otrovnih tvari. Također, tvrdnji o izjednačenju omjera ide u prilog sve bolja dijagnostika u suvremenom dobu. Kakogod, vremenski trend omjera muškaraca i žena u incidenciji može se razlikovati među zemljama te su potrebna dodatna istraživanja (8).

Srednja dob početka bolesti jest u dobnoj skupini 51–66 godina. Također, zamijećen je gradijent, s većom pojavnosću prvih simptoma u starijoj dobi u Europi, a to se objašnjava boljim kliničkim studijama koje uzimaju u obzir samo specifične karakteristike bolesti, a ne cijeli spektar kliničkih karakteristika za ALS. Početak bolesti raniji je u osoba s familijarnim oblikom bolesti nego sa sporadičnim oblikom, vjerojatno dijelom i kao rezultat bolje kontrole pacijenata koji u porodici imaju oboljelog od ALS-a (8).

Srednja dob postavljanja dijagnoze je 54-69 godina po nedavnim studijama. Zbog nespecifičnih početnih znakova, s dijagnozom se kasni između 9 do 24 mjeseci. Prediktori, poput spola i kognitivnih simptoma, značajno utječu na vrijeme dijagnoze. Zabilježeno je da je srednja dob pri postavljanju dijagnoze osam godina viša među pacijentima s kognitivnim oštećenjem u usporedbi s pacijentima bez kognitivnog oštećenja te je isto tako viša u žena (8).

Zbog kompleksnosti same bolesti te poteškoća u dijagnosticiranju i liječenju ALS-a, smrtnost je teško odrediti. Prema najnovijim istraživanjima pronađene su brojne činjenice koje su obećavajuće u unaprjeđenju dijagnoze, liječenja, predviđanja i kontrole ALS-a te se očekuje poboljšanje u prognozi i preživljenju (6).

1.3. Etiopatogeneza ALS-a

Amiotrofična lateralna skleroza je multifaktorijalna bolest. Ne postoji jedinstveni rizični čimbenik. Iako potpuni patofiziološki mehanizam ostaje nepoznat, postoje brojna istraživanja koja idu u prilog tome da bolest nastaje kao posljedica vrlo složene interakcije okolišnih, imunoloških, a nadasve genetskih čimbenika koji se sve više smatraju važnim čimbenikom degeneracije motoričkih neurona (7,11).

1.3.1. Genetski čimbenici ALS-a

U 90-95 % slučajeva, bolest se nalazi u formi sporadične amiotrofične lateralne skleroze (engl. *sporadic ALS*, sALS). Ukoliko postoji pozitivna obiteljska anamneza, tada se govori o familijarnom obliku amiotrofične lateralne skleroze (engl. *familial ALS*, fALS) i nalazi se u 5-10 % slučajeva. U novije vrijeme, prepoznat je fenotip ALS-a u kojem se uočava kognitivna disfunkcija oboljelih. Tako je nastao termin amiotrofična lateralna skleroza s frontotemporalnom demencijom (ALS-FTD) koji se objašnjava dijeljenim genetskim mehanizmom nastanka (11). ALS se može javiti u autosomno dominantnom obliku koji je ujedno i najčešći, zatim u autosomno recesivnom i X-vezanom obliku (5).

U zadnjih 30-ak godina, pronađeno je 30-50 novih gena povezanih s nastankom ALS-a. Otprilike u 30-50 % bolesnika s fALS pronađe se uzročni gen, dok se u sALS u 5-10 % slučajeva genetskom analizom nalaze geni povezani s nastankom ALS-a. Iako je identificiran veliki broj gena koji su potencijalno uzročni ili modificiraju bolest, među najučestalijim i najvažnijim genima odgovornim za nastanak bolesti su: gen za bakar/cink superoksid-dismutazu (SOD1), gen C9orf72 (engl. *chromosome 9 open reading frame 72*, C9orf72), gen TDP43/TARDBP (engl. *transactive response DNA binding*, TARDBP) i FUS gen (engl. *fused in sarcoma*, FUS). Ostale su varijante u drugim genima relativno rijetka pojava (11).

1.3.1.1. SOD1

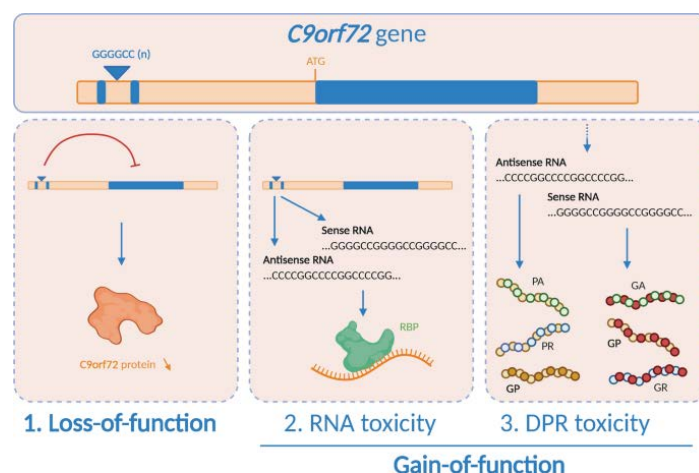
Prvi otkriveni mutirani gen odgovoran za nastanak bolesti bio je gen koji kodira metaloenzim bakar/cink superoksid-dismutazu. Protein veže bakar i cink tvoreći veoma stabilne homodimere. Dimeri se nalaze u citoplazmi i međumembranskom prostoru unutar mitohondrija. Osnovna funkcija metaloenzima SOD1 jest kataliziranje proizvodnje kisika i vodikovog peroksida iz superoksidnih spojeva nastalih staničnim metabolizmom, pružajući na taj način adekvatan mehanizam zaštite od antioksidansa koji mogu ozbiljno oštetiti stanicu.

Identificirano je 185 patogenih varijanti SOD1. Nedavna su istraživanja pokazala da patološke varijante SOD1 čine oko 15–30 % slučajeva fALS, te manje od 2 % slučajeva sALS-a. Sami fenotip, duljina trajanja i težina bolesti bitno se razlikuju ovisno o uzročnim varijantama. Studije su pokazale da aktivnost dismutaze nije u korelaciji sa samom težinom bolesti te govori u prilog tvrdnji da toksičnost SOD1 za motoričke neurone proizlazi iz dvaju molekularnih mehanizama: smanjene aktivnosti enzima te mehanizma toksičnog jačanja funkcije (12).

1.3.1.2. C9orf72

Ekspanzija C9orf72 u obliku heksanukleotidnih ponavljanja (GGGGCC), najčešći je genetski uzrok ALS-a, a osobito ALS-FTD spektra bolesti, ali se može pronaći i u drugim neurodegenerativnim bolestima. Jasna granica, odnosno broj ponavljanja koji je odgovoran za fenotipski izražaj bolesti nije definiran (11). U zdravoj populaciji uglavnom se nalazi 25 ponavljanja, dok se u oboljelih može naći od 100 do nekoliko tisuća ponavljanja. Točna funkcija i mehanizam toksičnosti, zasad ostaju nepoznati. Smatra se da je protein kojeg kodira C9orf72 odgovoran za transmembranski i celularni transport, degradaciju unutarstaničnih proteina te regulaciju presinaptičkih vezikula (13). Mutacija C9orf72, histološki se uočava u obliku inkluzijskih tjelešaca unutar neurona i glijalnih stanica. U literaturi se navodi kako je ova mutacija odgovorna za oko 40% fALS-a te za oko 20% ALS-FTD (12).

Pretpostavljeni molekularni mehanizmi toksičnosti, prema novijim istraživanjima su gubitak funkcije C9orf72 te takozvani "*gain of function*" mehanizam koji, u konačnici, dovodi do nakupljanja ponavljajućih di-peptidnih proteina (11,13,14) (Slika 2).



Slika 2. Pretpostavljeni mehanizmi nastanka patoloških promjena u ALS/ALS-FTD (preuzeto s: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-020-02214-x#citeas>)

Literatura navodi ostale pretpostavljene mehanizame toksičnosti C9orf72, a to su poremećaji na razini unutarstaničnih procesa. Upravo mehanizmi, prikazani na slici 2., u osnovi su uzrok neadekvatnom procesuiranju i metabolizmu ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) te uzrokuju oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA). Mutacijom su na taj način pogođeni proteostatski putovi, celularni transporti, neuron specifični procesi te, u konačnici, funkcija imunog i mikroglijalnog sustava (15).

1.3.1.3. TARDBP

U slučaju mutacije TARDBP dolazi do disfunkcije TAR-DNA-vezujućeg proteina 43 (TDP-43) koji veže DNA i RNA te ima ulogu u procesu obrade RNA. Histološka istraživanja su utvrdila da je TDP-43 prisutan u citoplazmatskim nakupinama u većine bolesnika s ALS-om. Obično je protein lokaliziran unutar jezgre te se transportira između jezgre i citosola. TDP-43 omogućuje regulaciju ekspresije gena, zatim preradu, regulaciju stabilnosti i transporta RNA te, u konačnici, regulaciju procesa translacije RNA (12,16). Citosolna akumulacija proteina usporedna je s gubitkom nuklearnog TDP-43, što navodi na pretpostavku da je u mehanizam bolesti uključen gubitak normalne funkcije TDP-43 unutar jezgre, toksično jačanje funkcije ili pak oboje (12).

U zdravih članova obitelji oboljelog od ALS-a, pronađeni su zdravi nosioci mutacije, što upućuje na nekompletnu penetrantnost gena koja raste s dobi. Prevalencija mutacije TARDBP iznosi 4–6 % u fALS-u, dok je u samo 1% slučajeva prisutna u sALS-u (11).

1.3.1.4. FUS

FUS kodira protein odgovoran za stanični rast promocijom DNA transkripcije i produkcije proteina (17). U histološkom nalazu, karakteristično se nalaze patološki agregati FUS-a. Studije su pružile snažne dokaze kako je mehanizam jačanja funkcije glavni molekularni mehanizam nastanka bolesti u FUS-ALS. Točan mehanizam toksičnosti nije jasan, ali postoje studije koje dokazuju izravnu toksičnost agregata FUS-a (12). Prisutnost mutacije FUS-a iznosi 4% u oboljelih od fALS-a (11).

1.3.1.5. Očekivanja od razumijevanja genetskih čimbenika za ALS

Iako postoje brojne potvrđne studije o značajnosti genetske podloge razvoja ALS-a, mnoge varijante gena koje su uzrok ili predisponiraju bolesnika za razvoj ALS-a, zasad su nepoznate. Isto tako, zbog velikog broja staničnih procesa uključenih u razvoj ALS-a, složene prirode bolesti te zbog velike genetske i fenotipske heterogenosti bolesti, utvrđivanje uzročnih mehanizama je također otežano te oboljeli i dalje imaju kratki očekivani životni vijek od trenutka postavljanja dijagnoze (12).

Zahvaljujući velikim naporima u razumijevanju genetskih čimbenika koji se nalaze u podlozi ALS-a i ALS-FTD spektra bolesti, omogućen je put za brojne inovativne terapijske intervencije te su očekivanja velika (11).

1.3.2. Okolišni čimbenici ALS-a

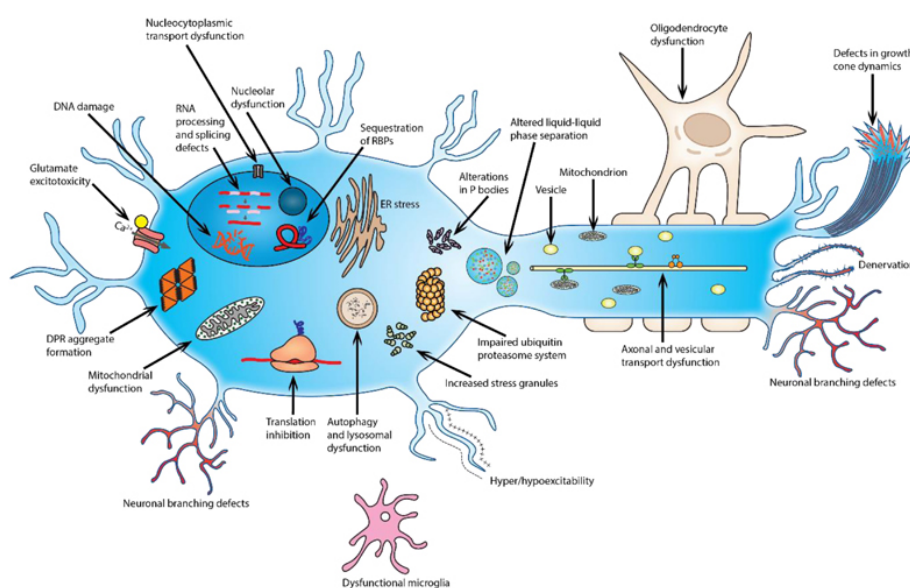
Pronalazak okolišnih uzroka, ograničen je činjenicom da se radi o vrlo rijetkoj bolesti. ALS se javlja u starijoj životnoj dobi te izloženost potencijalnim čimbenicima može varirati i do nekoliko desetljeća unazad čime se teško može uspostaviti uzročno-posljedična veza agensa i nastanka bolesti (18). Isto tako u ALS-u, za sada, nije utvrđen gen koji daje povećanu osjetljivost na izloženost okolišnom čimbeniku (19).

Brojna su epidemiološka istraživanja napravljena u svrhu pronalaska povezanosti ALS-a i okolišnih čimbenika. Unatoč velikom naporu, pronađen je samo jedan, sigurni uzročni okolišni čimbenik – pušenje (7,10,18) te se kao rizični čimbenik primarno vezuje uz ženski spol (12). Ostali pretpostavljeni okolišni rizični faktori su: teški metali (osobito živa i olovo), izloženost elektromagnetskim poljima, pretjerana fizička aktivnost, mehanička trauma glave, virusne infekcije, organofosfatni pesticidi i herbicidi te u konačnici, prehrana. U literaturi se navodi i niži socioekonomski status kao rizični čimbenik, međutim to uključuje veliki broj poslova i zanimanja u kojima su osobe izložene prije navedenim rizičnim čimbenicima (7,12,18).

Jasan mehanizam toksičnosti okolišnih čimbenika nije poznat te niti jedan okolišni čimbenik nije doveden u nepobitnu vezu s nastankom ALS-a (12). Smatra se da degenerativne promjene nastaju kao rezultat kombinacije neurotoksičnosti okolišnih čimbenika i povećanja oksidativnog stresa s posljedičnim oštećenjem živčanih stanica (7,18).

1.3.3. Potencijalni patomehanizmi ALS-a

Iako su napravljene brojne studije, patogeneza ALS-a još uvijek nije u potpunosti jasna. Čimbenici koji iniciraju proces neurodegeneracije su različiti među pojedinim pacijentima, ali jednom kad bolest progredira, patofiziološki mehanizmi su slični ili pak isti. Neki od faktora koji se povezuju s povećanom osjetljivošću motoričkih neurona su: veličina živčanih stanica, zahtjevne metaboličke potrebe dugoživućih stanica, velika ovisnost o normalnom funkcioniranju mitohondrija te pretjerana osjetljivost na ekscitotoksičnost i poremećenu homeostazu prometa kalcija. Brojni su stanični i molekularni mehanizmi uključeni u neurodegenerativni proces poput disfunkcije mitohondrija i aksonskog transporta, toksična agregacija proteina i njihova poremećena razgradnja, ekscitotoksičnost, oksidacijski stres, upala, poremećaj metabolizma RNA te smanjena neurotrofična potpora glijalnih stanica (Slika 3). Neki od navedenih poremećaja mogli bi se objasniti kao sekundarni fenomen, primarno kao posljedica poremećaja na razini genetske komponente (12).



Slika 3. Stanični i molekularni mehanizmi uključeni u patogenezu ALS-a (preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6417666/>)

Od najznačajnijih i najviše istraživanih mehanizama su: ekscitotoksičnost, ozljeda neurona kao posljedica oksidativnog stresa, agregacija abnormalnih proteina koji su zakazali funkcijom te koji uzrokuju disfunkciju u aksonskom transportu (4,15).

1.3.3.1. Ekscitotoksičnost

Glutamat, glavni ekscitacijski neurotransmiter SŽS-a, oslobađa se depolarizacijom aksonalnog završetka. Tijekom neurotransmisije, glutamat iz presinaptičkog neurona aktivira ionotropne glutamatne receptore na postsinaptičkom neuronu. Posljedično, dolazi to utoka kalcija i stvaranja akcijskog potencijala na postsinaptičkom neuronu (20).

Ekscitotoksičnost, jedan od pretpostavljenih mehanizama neurotoksičnosti, nastaje kao posljedica prekomjerne stimulacije glutamatnih receptora koja, u konačnici, ima za rezultat degeneraciju motoneurona. Istraživanja su pokazala kako ekscitotoksičnost zahvaća selektivno motoneurone te kako su oni najosjetljiviji na glutamat i ekscitotoksičnost (7,20). Ta se činjenica objašnjava time da su motoneuroni izrazito osjetljivi na poremećaje funkcije mitohondrija te da imaju mali puferski kapacitet za unutarstanični kalcij (21). Jedna je studija pokazala da razlog povećane osjetljivosti leži u različitoj ekspresiji kalcijevih receptora u odnosu na ostatak SŽS-a (22).

Postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama djelovanja ekscitotoksičnosti. Direktni mehanizmi uključuju povećano otpuštanje glutamata i smanjeni "re-uptake" glutamata glijalnim stanicama. U normalnim uvjetima u SŽS-u, ekstracelularna koncentracija glutamata je izrazito niska, dok je visoka koncentracija intracelularno. Pretpostavljeni mehanizmi nastaju kao posljedica u alteraciji ekspresije receptora uključenih u regulaciju prometa glutamata te kalcijevih kanala (23). Sami utok kalcija se također smatra odgovornim za toksičnost. Najvažnija metabolička zadaća iona kalcija jest regulacija brojnih enzimskih putova. Upravo prekomjernim utokom kalcija može doći do brojnih disregulacijskih enzimskih poremećaja s posljedičnom staničnom apoptozom (7). Samim tim, apoptoza je izvor novog oslobađanja još veće koncentracije glutamata u ekstracelularni prostor koji djeluje ekscitotoksično (7,23).

1.3.3.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres smatra se jednim od primarnih faktora koji iniciraju oštećenje neurona u ALS-u. Nastaje kada kapacitet staničnog zaštitnog antioksidacijskog sustava bude prezasićen. Za posljedicu ima nemogućnost potpunog uklanjanja slobodnih kisikovih radikala koji nastaju metaboličkim procesima (23). Brojna istraživanja su potvrdila da neadekvatno uklanjanje i akumuliranje slobodnih kisikovih radikala, koje uzrokuje brojna oštećenja makromolekula poput DNA, proteina i fosfolipida, jest jedan od mehanizama toksičnosti u pacijenata s ALS-om (24).

Mitochondriji proizvode većinu reaktivnih kisikovih radikala koji nastaju kao nusprodukt staničnog disanja. Iako su potrebna dodatna istraživanja, ova činjenica upućuje na postojanje potencijalnih patogenih mehanizama povezanih s mitohondrijima kod ALS-a. To uključuje poremećaj mitohondrijske funkcije agregiranim produktima gena povezanih s ALS-om, poremećeno uklanjanje oštećenih mitohondrija autofagijom te oštećenje mitohondrija zbog nenormalne obrade RNA (23).

1.3.3.3. Agregacija abnormalnih proteina i abnormalni aksonski transport

U normalnoj živčanoj stanici, ključno je održavanje normalne strukture i funkcije kako bi se omogućila uredna komunikacija unutar stanice te između susjednih živčanih stanica. Normalan raspored i funkcija proteina, nužni su za normalnu udaljenu komunikaciju tijela stanice i terminalnih sinapsi. Abnormalna agregacija i aksonski transport, smatraju se jednim od mehanizama nastanka kako ALS-a, tako i drugih neurodegenerativnih bolesti (23).

Središnje obilježje ovog patomehanizma jest nakupljanje ubikvitiranih agregata unutar neurona koji nisu nužno ograničeni samo na leđnu moždinu. Inkluzije se mogu pronaći i u drugim dijelovima mozga, poput frontalnog i temporalnog režnja mozga (25). Iako točan mehanizam nastanka i toksičnosti proteinskih agregata nije u cijelosti poznat, smatra se da nastaju kao posljedica mutiranog RNA-vezujućeg proteina (engl. *RNA binding protein*, RBP) (26). Osnovna funkcija RBP-a jest regulacija genske ekspresije, osobito regulacija post-transkripcijskih procesa poput "*splicing-a*", transporta, modulacije ekspresije i razgradnje glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) (27).

1.3.3.4. Ostale teorije patogeneze ALS-a

U patogenezi ALS-a, razmotreni su također mehanizmi koji u podlozi imaju imunološku podlogu te deficit neurotrofičnih čimbenika (7).

Postoje rastući dokazi o neuroinflamaciji kao uzroku ALS-a. Karakteristično dolazi do prekomjerne aktivacije mikroglije i astrocita koji luče prekomjerne razine proupalnih citokina s posljedičnom infiltracijom T limfocitima. Astrociti u SŽS-u osiguravaju trofičku potporu neuronima, reguliraju sinapse i osiguravaju druge homeostatske funkcije. Izlučivanje upalnih citokina iz aktivirane mikroglije dovodi do potencijalno neurotoksične aktivacije astrocita koji mogu pridonijeti smrti neurona i oligodendrocita (7,23).

Neurotrofični čimbenici, u osnovi čimbenici rasta neurona, neophodni su za regulaciju svih živčanih stanica. Postmortalno u oboljelih od ALS-a, uočena je smanjena razina ovih čimbenika te se iz te činjenice pretpostavlja da je njihov deficit jedan od mnogobrojnih uzroka u patogenezi ALS-a (7).

1.4. Patohistološka obilježja ALS-a

Glavna patohistološka karakteristika ALS-a jest propadanje GMN i DMN. Istraživanja su pokazala da može doći do gubitka 50% motoričkih neurona. Oštećenja motoričkih neurona su asimetrična, na što dodatno upućuje asimetrična klinička slika ALS-a (7).

1.4.1. Patohistološke promjene

Promjene GMN-a očituju se u obliku gubitka Betzovih stanica motoričkog korteksa (Brodmanovo područje 4), degenerativnih promjena prefrontalne motorne kore mozga, astrocitne glioze koja obuhvaća bijelu i sivu tvar te gubitka aksona descendnog piramidalnog puta (7).

Glavna patohistološka promjena DMN-a uključuje atrofiju alfa motornih stanica u prednjim rogovima leđne moždine. Unutar prednjih rogova leđne moždine dolazi do neproporcionalog gubitka mijeliniziranih vlakana unutar motoričkog neurona. Sama degeneracija najviše se očituje u cervikalnom i lumbalnom segmentu. Kao posljedica ovih procesa, mišićna vlakna pokazuju karakterističnu denervacijsku atrofiju. Od degeneracije su pošteđeni jedino motorički neuroni živaca odgovornih za bulbomotoriku te motorički neuroni u sakralnim segmentima leđne moždine odgovorni za inervaciju vezikorektalnih sfinktera (7).

Na razini stanice, ostali neuroni pokazuju atrofiju i sadrže inkluzije koje se specifično mogu pronaći kod ALS-a, i to u velikom postotku slučajeva, ali ne i kod drugih neurodegenerativnih stanja. Neke od tih inkluzija su hijaline eozinofilne inkluzije, imunoreaktivne inkluzije poput ubikvitinskih proteina, bazofilne inkluzije koje obiluju RNA te patološke nakupine fosforiliranih neurofilamenata unutar tijela motoričkih neurona i u početnom dijelu aksona (7).

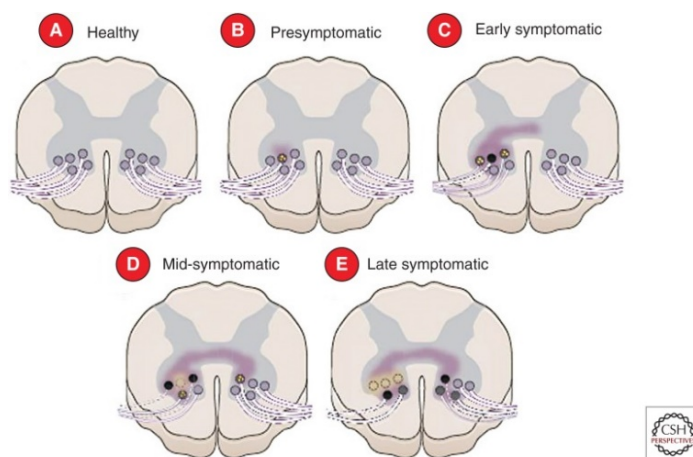
1.4.2. Neuroanatomska propagacija ALS-a

Dokaze o početnom žarištu i načinu neuroanatomske propagacije bolesti teško je utvrditi. U literaturi se navodi razlog za to, a to je da se neuropatologija otkriva *postmortem*, stoga odražava akumulaciju patoloških promjena tijekom bolesti. Studije su presječne i često ih je teško povezati s kliničkim fenotipovima uključujući mjesto kliničkog početka, distribuciju između promjena GMN i DMN i kinetiku širenja bolesti. Međutim, uočen je gradijent gubitka neurona koji potječe unutar kolumne DMN u leđnoj moždini (28).

Značajke zajedničke većini fenotipova ALS-a, osim primarne degeneracije motornih neurona, su žarišna početna neuropatologija i progresivno kontinuirano širenje. Inicijalni simptomi pojavljuju se žarišno u nasumičnim dijelovima tijela. Studije time sugeriraju da je u početku bolesti patološki proces koji je u podlozi kliničkih simptoma žarišan, tj. nasumično smješten u živčanom sustavu (28).

Kliničkim promatranjem, zajedno s metodama funkcionalnog oslikavanja, identificirane su dvije vrste neuroanatomske propagacije ALS-a: kontinuirano širenje i mrežno širenje. Kontinuirano širenje napreduje s jedne strane tijela na drugu, neovisno o sinaptičkoj povezanosti. Mrežno širenje napreduje s jednog kraja na drugi u funkcionalno i anatomski povezanim dijelovima te stoga ovisi o sinaptičkoj povezanosti (28).

Bolest napreduje kontinuitetom na dva načina. Motorička disfunkcija u žarišnoj zdravoj regiji tijela gdje se simptomi inicijalno javljaju (Slika 4A), postaje progresivno gora u istoj regiji tijekom vremena (Slika 4B, Slika 4C). Drugi način uključuje motoričku disfunkciju koja se širi prema van u susjedne regije, napredujući s jedne strane tijela na drugu ili s jedne regije na drugu (Slika 4D, Slika 4E) (28).



Slika 4. Neuroanatomska propagacija ALS-a. A) Zdrava faza. B) Presimptomatska faza. C) Rana faza. D) Srednja faza. E) Kasna faza. (preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5538408/>)

Žarišno područje tijela gdje se inicijalno pojavljuju simptomi je područje koje ima maksimalnu degeneraciju GMN i DMN, što upućuje na to da su na početku bolesti degeneracije GMN i DMN te perifernih mišića povezane, a ne neovisne. Nakon što bolest započne i progredira, degeneracija se nastavlja neovisno o razinama GMN i DMN. Udaljenost širenja i početni znakovi degeneracije koji se inicijalno javljaju unutar jedne regije tijela, različito napreduju između razina u drugim regijama tijela tijekom vremena, a motorički deficiti postaju sve složeniji, što kasnije rezultira sve većom složenosti fenotipova (28).

1.5. Klinička slika ALS-a

U kliničkoj slici ALS-a, kao fatalnoj neurološkoj bolesti motoričkih neurona mozga, moždanog debla i leđne moždine, nalaze se znakovi oštećenja i GMN i DMN (7). Ovisno o distribuciji zahvaćenosti GMN ili DMN proizlazi i izrazito heterogeni fenotip u oboljelih od ALS-a (6). Ne postoji jasno definiran raspored početnih simptoma i njihovo daljnje širenje. Najčešći inicijalni simptom je mišićna slabost koja se javlja u ekstremitetima. Klinički nalaz je asimetričan, a s vremenom se širi unutar iste regije, na suprotnu stranu ili ostale regije tijela (7,12).

1.5.1. Kliničke varijante ALS-a

Kliničke varijante ALS-a mogu se klasificirati na temelju anatomskeg područja i razine koje je zahvaćeno neurodegenerativnim procesom te na temelju područja tijela koje je zahvaćeno u početku bolesti (28).

1.5.1.1. Klasifikacija na razini temeljne patologije

Ukoliko se nalazi klinički znakovi zahvaćenosti GMN i DMN, govori se o "*klasičnom*" ALS-u. Uglavnom se nalazi podjednaka zahvaćenost GMN i DMN. Slabost mišića javlja se u diskretnom dijelu tijela te napreduje tokom vremena i na druge regije tijela. Simptomi se najčešće inicijalno javljaju u jednoj od tri glavne regije tijela, a to su glava, ruke ili noge. Rijetko se neurološki ispadi javljaju kao prvi klinički simptom u mišićima trupa te mišićima odgovornih za respiraciju (28).

Slučajevi kod kojih postoji dulje preživljenje ili čista zahvaćenost ili GMN ili DMN, upućuju na "*atipične*" oblike ALS-a. Ovi atipični oblici mogu sadržavati primjere spastične paraplegije, autoimunih bolesti ili demijelinizirajućih bolesti DMN-a (28).

Izolirani sindrom s prezentacijom zahvaćenosti GMN-a, naziva se primarna lateralna skleroza (PLS) te nikada ne zahvaća DMN (5). Udio ovih pacijenata je 2–3,7 %. U većine pacijenata s PLS-om, simptomi počinju u nogama kao spastična parapareza koja se tijekom dugog razdoblja širi relativno simetrično do ruku i bulbarnih mišića s posljedičnom pseudobulbarnom paralizom (12). Bolesnici s klinički izraženim PLS-om i bez abnormalnosti elektromiografije (EMG), nakon pojave inicijalnih simptoma često mogu preživjeti desetljećima. Bolesnici s manjim promjenama EMG-a ili zahvaćanjem DMN-a mogu imati znatno niže preživljenje i lošiju prognozu, što je u skladu s pacijentima s "*klasičnim*" ALS-om (28).

Najrjeđa klinička varijanta je progresivna mišićna atrofija (PMA) s pojavnosti od 2,4% (12). Prezentira se kao izolirani sindrom s dominantnim zahvaćanjem DMN-a, kao posljedica degeneracije prednjeg roga leđne moždine (4,5). Ova klinička varijanta ima obično nešto povoljniji ishod u odnosu na ostale oblike (12).

1.5.1.2. Klasifikacija na temelju inicijalno zahvaćene regije tijela

Jedan od inicijalnih simptoma ALS-a može biti i bulbarna paraliza (paraliza mišića govora, žvakanja i gutanja) u kojoj je naznačeno zahvaćen DMN. Simptomi bulbarne paralize povezuju se s lošijom prognozom. Različitim studijama je dokazano da početak s bulbarnom prezentacijom čini 19–28 % od ukupnog broja pacijenata. Tipično, slabost progredira do donjih cervikalnih i gornjih torakalnih miotoma, te, u konačnici, do lumbosakralnih miotoma. U odsutnosti progresije, što je izrazito rijetka pojava, radi se o progresivnoj bulbarnoj paralizi (PBP) (12). Pseudobulbarna varijanta je indikativna za pretežno zahvaćanje GMN. I bulbarni i pseudobulbarni oblik bolesti imaju sličnu progresiju (28).

Početni nastup ALS-a u udovima, javlja se u više od dvije trećine pacijenata te se smatra tipičnim oblikom ALS-a. ALS s početkom u ekstremitetima sastoji se od nekih varijanti koje su pretežno sindromi DMN, a koji imaju tendenciju polagane progresije (28).

Od ostalih varijanti postoji još hemiplegična varijanta ALS-a s kombinacijom zahvaćenosti GMN i DMN izolirano na jednoj strani tijela. Zatim se izdvaja "*flail-arm*" sindrom s pojavnosti oko 10% te s prezentacijom u obliku simetrične proksimalne i distalne bibrachijalne atrofije gdje se uočavaju dodatni znakovi zahvaćanja kortikospinalnog puta (pozitivan Babinski) (12).

Klinički fenotipovi ALS-a također mogu uključivati nemotoričke regije. U kliničkoj slici mogu se uočiti kognitivni i psihički ispadi s naznačenom demencijom. Postoji razlika u preživljenju od više od 1 godine između bolesnika s ALS-FTD u usporedbi s onima koji imaju obični ALS (28).

1.5.2. Simptomi ALS-a

Amiotrofična lateralna skleroza prezentira se kao slabost i atrofija voljne muskulature. U dvije trećine pacijenata bolest počinje zahvaćanjem distalnih dijelova ekstremiteta, najčešće malih mišića šake, a zatim progredira na ostale dijelove tijela. U jedne trećine pacijenata može se javiti bulbarni oblik bolesti, obično s bržom progresijom bolesti (5,7). U samo 5% slučajeva bolest inicijalno zahvaća respiratornu muskulaturu, bez drugih znakova bolesti. Jednom kad bolest nastupi, nezaustavljivo progredira i zahvaća svu voljnu muskulaturu s fatalnim ishodom, primarno zbog respiratorne insuficijencije (7).

Mišići bulbomotorike i vezikorektalni mišići odgovorni za kontrolu funkcije, u pravilu su pošteđeni, osobito u početku bolesti, dok se u uznapredovaloj bolesti može razviti disfunkcija ovih mišića. Motorički neuroni koji inerviraju dno zdjelice te vezikorektalne sfinktere, pošteđeni su od oštećenja u ALS-u (5,7,12).

Iako nekolicina pacijenata navodi blage osjetne ispade u distalnim ekstremitetima, osjetni simptomi su u pravilu odsutni te u ALS-u tipično nema zahvaćanja osjetnog sustava (5,7,12). Ekstrapiramidni simptomi su rijetki i javljaju se u oko 5% pacijenata. Istraživanja su pokazala da u ALS-u ne dolazi do zahvaćanja autonomnog živčanog sustava, iako postoje studije koje sugeriraju da postoji simpatička denervacija srca u ranim stadijima bolesti (12).

Simptomi GMN javljaju se kao posljedica oštećenja kortikospinalnog i kortikobulbarnog puta, a jedan od prvih znakova je gubitak fine motorike. Prisutna je mišićna slabost koja je blaga u početku bolesti i nije izražena kao kod oštećenja DMN. Od ostalih simptoma propadanja GMN javljaju se spastičnost, hiperrefleksija te pojava patoloških refleksa poput Babinskog čija prisutnost korelira s oštećenjem kortikospinalnog puta. Ispad kortikobulbarnoga puta prezentira se kao spastička bulbarna paraliza. Očituje se poteškoćama u žvakanju, sijalorejom, disfagijom i dizartrijom. Veoma se često javlja karakteristični fenomen, pseudobulbarni afekt. Zbog gubitka inhibicije motoričkih neurona limbičkog sustava, postoji slaba kontrola emocija koju onda prate spontani napadaji smijeha i plača (5,7,12).

Neurodegeneracija DMN-a očituje se mišićnom slabošću i atrofijom, ali je slabost izraženija i udružena s većim stupnjem atrofije nego kod oštećenja GMN. Kao posljedica smanjenja broja funkcionalnih motoričkih jedinica, veća je progresija slabosti i to je glavni znak ALS-a. Miotatski refleksi su smanjeni ili izgubljeni u potpunosti, dok kod pasivnog razgibavanja ruku i nogu nema otpora (7,12).

Iako rijedak početni simptom, važan znak ALS-a su fascikulacije. Prezentiraju se nevoljnim, bezbolnim titranjem mišića zbog nevoljne kontrakcije mišićnih vlakana. Na površini se jezika često uočavaju fascikulacije. U uznapredovaloj bolesti, svi bolesnici među kliničkim simptomima imaju fascikulacije te u izostanku istih, nužno je ponovno razmatranje dijagnoze (7,12).

Novija istraživanja su potvrdila kognitivne i bihevioralne promjene kao sastavni dio nekih oblika ALS-a. Do 50% oboljelih od ALS-a ima kognitivne promjene i promjene u ponašanju. Najčešći bihevioralni simptomi su apatija i gubitak empatije i nalaze se u oko 10% slučajeva. Od kognitivnih domena najčešće su zahvaćeni govor, pamćenje, fluentnost govora, socijalna kognicija te egzekutivne funkcije (12).

1.6. Dijagnostika ALS-a

Zbog raznolikosti kliničke slike ALS-a, uz nedostatak osjetljivog i specifičnog biomarkera, kao i neuroradiološkog biljega, dijagnoza je bolesti izazovna (11). Mnoge bolesti mogu imitirati ALS (7), stoga se dijagnoza ALS-a postavlja kada se s velikom sigurnošću isključe druge bolesti koje mogu uzrokovati moguće simptome zamijećene u bolesnika (11). Za postavljanje dijagnoze koristi se revidirana verzija El Escorial kriterija, takozvani *Gold Coast* kriteriji iz 2019. godine (11,29). El Escorial kriteriji temelje se na dva postulata. Prvi je progresija motoričkog deficita GMN i DMN u barem jednom ekstremitetu odnosno regiji. Drugi postulat uključuje postojanje simptoma oštećenja DMN klinički u jednoj regiji i/ili EMG znakovi oštećenja DMN u dvije regije (6,12). Kriteriji su važeći ako su ekstenzivnom dijagnostičkom obradom isključene druge bolesti (11).

1.6.1. Dijagnostički algoritam ALS-a

Zbog nedostatka specifičnih dijagnostičkih kriterija, dijagnoza ALS-a prvenstveno se temelji na kliničkom nalazu u pacijenta. Ostale dijagnostičke pretrage, poput laboratorijskih, slikovnih i elektrofizioloških pretraga, u osnovi se koriste za isključenje drugih ALS imitirajućih bolesti, a ne za dijagnosticiranje bolesti (6).

Prvi korak u postavljanju dijagnoze je anamneza i neurološki pregled. Ukoliko se u pacijenta srednje životne dobi javi brzoprogresivna spastična ili atrofična slabost bez značajnih osjetnih ispada, opravdano je posumnjati na ALS. Tokom neurološkog pregleda, najvažnije je ispitivanje mišićnog tonusa i snage koja se ocjenjuje na ljestvici od 0 do 5, gdje 5 označuje normalnu mišićnu snagu, a 0 mišićnu paralizu (7).

Važna pretraga je EMG kojom se mogu vidjeti znakovi akutne ili kronične denervacije. U početku bolesti promjene su nespecifične, ali s napredovanjem bolesti može se registrirati abnormalna spontana aktivnost (7). U akutnoj denervaciji vide se fibrilacije i pozitivni oštri valovi, dok se u kroničnoj denervaciji mogu vidjeti akcijski potencijali motoričke jedinice koji su produljeni, velikih amplituda, često polifazični izbijajući frekvencijom <10 Hz (12).

Od slikovnih pretraga, važno mjesto zauzima magnetska rezonanca (MR). MR-om je važno isključiti ostala strukturalna i upalna stanja koja mogu imitirati ALS. Nije potrebno raditi MR kod klinički sigurnog ALS-a prema WFN kriterijima (engl. *World Federation of Neurology*). Na MR-u pacijenta može se vidjeti povišen signal piramidalnog puta i smanjen signal primarnog motornog korteksa (7,12). Kod ALS-FTD moguće je uočiti atrofiju frontalnog i temporalnog režnja te smanjeni metabolizam unutar frontotemporalnih regija i u prednjem cingularnom girusu (11).

Od ostalih pretraga rade se analize seruma, likvora te urina. Biopsija mišića nije nužna, ali je neophodna u svrhu isključivanja drugih bolesti. Histološki nalaz koji se može naći u ALS bolesnika najčešće uključuje hipertrofična mišićna vlakna i mali broj nekrotičnih vlakana (7,12).

1.6.2. Diferencijalna dijagnoza ALS-a

Diferencijalna dijagnoza ALS-a je široka i uključuje brojne bolesti. Dijagnozu ALS-a, relativno je lako postaviti kada je bolest uznapredovala s potpuno razvijenom kliničkom slikom. Pacijenti u ranoj fazi, najčešće se prezentiraju s predominantnim znakovima oštećenja ili GMN ili DMN zasebno (30).

U grupu takozvanih ALS imitatora spadaju mnogobrojna nasljedna, neoplastična, paraneoplastična, infektivna, sistemska i velikim dijelom razna neurološka stanja koja se inicijalno mogu prezentirati slabosti GMN ili DMN (5). Za dijagnozu ove teške bolesti, zbog nedostatka specifičnih biokemijskih i slikovnih biljega, od iznimne je važnosti isključiti sve prije navedene moguće uzroke bolesti, štoviše zbog drugačije terapijske intervencije nekih bolesti, ali i prognoze koja ne mora nužno biti loša (31,32).

Unatoč inovativnijim terapijskim pristupima u liječenju ALS-a, i dalje ostaje bolest koja, u konačnici, ima kratko preživljenje i fatalni ishod, stoga je važno na vrijeme otkriti alternativnu bolest, ukoliko postoji (6,32). Brojne ALS imitirajuće bolesti, imaju znatno mnogo bolju prognozu, ali i širi izbor mogućnosti liječenja, ovisno o uzroku (31,32).

U Tablici 1 sažeto su prikazane diferencijalne dijagnoze na temelju anatomske lokalizacije kliničke prezentacije.

Tablica 1. Diferencijalna dijagnoza ALS-a

| Anatomska lokalizacija | Diferencijalna dijagnoza |
|-----------------------------------|---|
| Mozak | Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, cerebrovaskularne bolesti, prionske bolesti, virus humane imunodeficijenicije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i> , HIV), multipla sistemna atrofija, spinocerebelarna atrofija |
| Moždano deblo, leđna moždina | tumorski proces, plak, infarkt u moždanom deblu, proces u foramen magnumu, siringobulija, Kenneddjeva bolest, spondiloza, multipla skleroza, HIV, subakutna kombinirana degeneracija, adrenomijeloneuropatija, hereditarna spastična parapareza |
| Prednji rog leđne moždine (DMN) | spinalna mišićna atrofija, Kennedyjeva bolest, monomelična amiotrofija, manjak hekosominidaze A (Tay Sachs), postpoliomijelitis sindrom, paraneoplastični sindrom |
| Korijen, pleksus, periferni živci | radikulopatija, dijabetička poliradikuloneuropatija, poliradikulopatije raznih infektivnih i metaboličkih uzroka, neuralgična amiotrofija, multifokalna motorna neuropatija, mononeuropatije |
| Neuromuskularna spojnica | Lambert Eaton sindrom, miastenija gravis |
| Mišić | <i>"inclusion body"</i> miozitis, okulofaringealna distrofija, miotona distrofija, izolirana miopatija ekstenzora vrata, metaboličke i kongenitalne miopatije |
| Sistemska | hipertiroidizam, hiperparatiroidizam, sindrom benignih fascikulacija, sindrom grčeva i fascikulacija |

Preuzeto i prilagođeno prema: Bilić E, Sitaš B, Borovečki F, Pavliša G, Zemba Čilić A. Terapijski pristupi osobama oboljelim od amiotrofične lateralne skleroze. Od razgovora do lijekova. U: Bilić E, urednik. Smjernice za liječenje neuromuskularnih bolesti – 1. dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2021. str. 137-63.

1.6.3. Ljestvica funkcionalne ocjene ALS-a

Zbog uvođenja brojnih novih potencijalnih lijekova u razna klinička ispitivanja s ciljem praćenja dinamike progresije raznih oblika ALS-a, uvedena je ocjenska ljestvica koja obuhvaća razne kliničke prezentacije bolesti, a zove se ljestvica funkcionalne ocjene ALS-a (engl. *ALS functional rating scale*, ALSFRS) (12). Jedina mana izvorno dizajnirane ljestvice bilo je neadekvatno ponderiranje disfunkcije udova i bulbarne muskulature u usporedbi s disfunkcijom respiratorne muskulature. Stoga je predložena revidirana verzija ALSRS-a (ALSFRS–R) koja uključuje dodatne procjene dispneje, ortopneje i potrebe za ventilacijskom potporom (33).

Ljestvica se sastoji se od 12 stavki za procjenu bulbarne funkcije (govor, salivacija, gutanje), motoričke funkcije (rukopis, rezanje hrane +/- gastrostoma, oblačenje i higijena, okretanje u krevetu, hodanje, hod uz stepenice) i respiratorne funkcije (dispneja, ortopneja, respiratorna insuficijencija), a svaka se stavka boduje od 0 (potpuna nemogućnost) do 4 (normalna funkcija). Ukupni zbroj je 48 bodova. Što je veći zbroj bodova, bolja je kvaliteta životnih funkcija i može se praćenjem povezati sa sporijom progresijom bolesti i boljim preživljenjem (34). Istraživanja su pokazala značajnu korist u kliničkoj upotrebi ljestvice te su pokazala da rezultati ALSFRS-R značajno koreliraju s kvalitetom života. Time je naglašeno kako su kvaliteta svakodnevnih životnih funkcija snažna determinanta kvalitete života pacijenata s ALS-om (33).

1.7. Liječenje ALS-a

Unatoč brojnim naporima koji se ulažu, lijek kojim bi se zaustavila bolest sve do danas nije pronađen. Podjela terapijskih intervencija u ALS-u, sastoji se od farmakološkog pristupa te od potpornog liječenja simptomatologije ALS-a kojim se značajno poboljšava kvaliteta života (7).

1.7.1. Dostupna farmakoterapija za liječenje ALS-a

U okviru brojnih smjernica kako europskih tako i hrvatskih, jedini lijek koji je registriran kao standard u liječenju ALS-a je riluzol. Iako ovaj lijek ne može zaustaviti bolest, on značajno usporava napredovanje bolesti. Štoviše, riluzol, ukoliko je uveden dovoljno rano u terapiju značajno može utjecati na progresiju bolesti te je pokazano kako produžuje život u nekim slučajevima i do 18 mjeseci. Najbolji učinak pokazuje ukoliko bolest traje manje od 5 godina, ako pacijenti imaju vitalni kapacitet >60 % predviđenog te ako nisu traheotomirani. (12). U literaturi se postoji navođenje povoljnog učinka riluzola i u kasnijim stadijima bolesti

s produljenjem određenih faza ALS-a (35). Ukoliko su bolesnici na mehaničkoj ventilaciji, terapija riluzolom se ukida. Potpuni mehanizam djelovanja nije jasan, ali se smatra da lijek smanjuje glutamatergičku ekscitotoksičnost, smanjujući razinu glutamata raznim mehanizmima (12).

Od drugih registriranih medikamenata u ponudi postoji lijek edaravon. Odobren je u Japanu, Koreji i Americi, ali zasada nije registriran u Europi. Farmakodinamika edaravona uključuje uklanjanje slobodnih radikala, time smanjujući oksidativni stres. Primarno utječe na ALSFRS-R, ali ne i na preživljenje bolesnika (12).

Od ostalih suplemenata dostupni su antioksidansi (vitamin E i C) te visoke doze vitamina B12, ali istraživanja nisu dokazala njihovu sigurnu učinkovitost (5,36).

1.7.2. Lijekovi koji modificiraju tijek bolesti

Iako je trenutačno dostupan samo jedan lijek koji usporava bolest, brojna su istraživanja i ispitivanja u tijeku za pronalaskom drugih lijekova. U posljednjih pet godina, pronađena su četiri potencijalna lijeka koja bi se mogla odobriti za terapiju ALS-a (37).

Genska terapija primarno se smatra kao terapija budućnosti kako za druge bolesti tako i za ALS (7). Osobito za ovu vrstu liječenja, postoji nada u liječenju bolesti u presimptomatskoj fazi bolesti. To bi se postiglo praćenjem koncentracija lakog lanca neurofilamenta u krvi, koja je povećana 12–24 mjeseci prije pojave znakova oštećenja GMN i DMN u pacijenata s mutacijom SOD1 i C9orf72. Ovim pristupom bi se omogućilo liječenje u početku neurodegenerativnog procesa, a time bi se zaštitio velik broj motoričkih neurona (38).

Trenutačno od genske terapije postoji tofersen koji je izbor liječenja u bolesnika s mutacijom SOD1 (38). Iako su potrebna dodatna istraživanja, u literaturi se navodi povoljan učinak tofersena na smanjenje koncentracije proteina SOD1 (40).

Istraživanja su pokazala korist terapijom litijem, ali samo u specifičnom genotipu UNC13a gena. Pacijenti s genotipom C/C pokazali su bolji ishod od pacijenata s drugim genotipovima (41).

Unatoč velikom znanstvenom napretku u razumijevanju ALS-a, ova bolest ostaje još uvijek neizlječiva. Ipak, može se zaključiti da dolazi novo doba koje bi trebalo pružiti nadu oboljelima od ALS-a. Veliki dio te nade oslanja se na raniji početak skrbi i personalizirani tretman kao što je razvijeno s tofersenom. Središnji problem i pitanje ostaje dijagnosticiranje ALS-a na u ranom početku bolesti za sporadične pacijente za koje genetika nije toliko korisna kao za presimptomatske osobe s fALS i za koje trenutačno nema načina za ranije dijagnosticiranje ALS-a prije pojave kliničkih znakova (6).

1.7.3. Simptomatsko liječenje ALS-a

Simptomatska terapija vrlo je važan aspekt liječenja ALS-a. Prije svega, važno je osigurati adekvatan multidisciplinarni pristup za pacijenta i pacijentove skrbnike. Često bolesnik i njegovi bližnji pate od depresije s napredovanjem bolesti. Upravo iz tih činjenica proizlazi da psihološka pomoć i palijativna skrb mogu imati veći utjecaj na kvalitetu života bolesnika nego dostupna farmakoterapija (7). Glavni uzrok smrti bolesnika je respiratorna insuficijencija, stoga su učinkovite mjere zbrinjavanja respiratorne insuficijencije neophodne i poželjno ih je uključiti što ranije u terapiju ukoliko postoje simptomi. Pažljivo praćenje bolesti i liječenje respiratornih komplikacija značajno mogu poboljšati kvalitetu života pacijenata te njihov životni vijek (12).

Osnovna mjera zbrinjavanja u neuromuskularnih bolesnika je mehanička ventilacija. Apsolutnu prednost danas pred invazivnom mehaničkom ventilacijom i traheostomijom ima neinvazivna mehanička ventilacija (NIV) (12). Uz brojne komplikacije koje prate invazivne metode, pacijenti općenito daju prednost NIV-u (42). U situacijama kada postoji velika bulbarna disfunkcija ili nekontrolirano aspiriranje, traheostomija je neophodna (43). Brojne su studije (44-46) dokazale da primjena NIV-a u oboljelih od ALS-a ima veliki značaj u poboljšanju kvalitete života i produženju životnog vijeka (47).

U ALS pacijenata važno je kontrolirati mogućnost iskašljavanja koja može dovesti do respiratornog zatajenja. Funkcija se nadzire primjenom mjerača vršnog protoka zraka, uređajem izvorno namijenjen za kontrolu astme. Postoji podjela mjera potpomognutog kašlja, a to su ručno potpomaganje kašlja i mjere za povećavanje protoka zraka kroz dišne puteve čime se omogućuje uklanjanje sekreta (12).

Hipersalivacija, osim što je neugodna, povezana je s većom stopom aspiracijske pneumonije te samim time i respiracijskom insuficijencijom. U liječenju se koriste antikolinergici. Ukoliko nema učinka, neke studije sugeriraju korist uzimanja amitriptilina i botulinum toksina tipa A. Kao krajnje metode mogu se koristiti radijacija i kirurško odstranjenje žlijezda slinovnica (48).

Disfagija, s prevalencijom 48–100 %, vrlo je čest simptom, također dominantan u bolesnika s bulbarnim oblikom bolesti. Postupci koji se primjenjuju u olakšanju simptoma su razne dijetetske mjere i vježbe s ciljem olakšanja akta gutanja. Ukoliko prijašnji postupci ne pružaju zadovoljavajući učinak, primjenjuje se perkutana endoskopska gastrostoma (PEG) (12).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Primarni cilj ovoga istraživanja je utvrditi povezanost promjena u rutinskim laboratorijskim pretragama iz krvi s ALS-om.

Sekundarni ciljevi ovoga istraživanja su:

- Prikazati distribuciju općih varijabli kao što su spol, dob pacijenta, dob u trenutku dijagnoze, klinička prezentacija, inicijalno zahvaćena regija te predominacija oštećenja GMN/DMN;
- Prikazati učestalost i distribuciju patoloških nalaza laboratorijskih parametara iz krvi, analizirajući kreatinin, kreatin kinazu, albumine, lipide, hemoglobin, glukozu, C reaktivni protein (CRP) te elektrolite;
- Ispitati povezanost promjena u laboratorijskim parametrima sa uvodnim varijablama;
- Prikazati rezultate te usporediti podatke s drugim studijama.

2.2. Hipoteze

1. U pacijenata oboljelih od ALS-a postoje promjene u rutinskim laboratorijskim nalazima iz krvi;
2. Određeni laboratorijski parametri povezani su sa općim karakteristikama kao što su spol, dob, dob pri postavljanju dijagnoze i klinička prezentacija te mogu služiti kao potencijalni biomarkeri za ALS.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 26 pacijenata s dijagnozom ALS-a kojima su izvađeni krvni laboratorijski nalazi u svrhu rutinske obrade pacijenata. Kriteriji uključanja su osobe oboljele od ALS-a, dostupna dokumentacija laboratorijskih parametara te osobe starije od 18 godina.

3.2. Ustroj istraživanja

Istraživanje je provedeno u Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split u obliku retrospektivnog kohortnog istraživanja. Analizirani su dostupni podaci od 2017. do 2021. godine koji su prikupljeni iz arhive Klinike za neurologiju KBC Split.

3.3. Etička načela

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split odobrilo je ovo istraživanje rješenjem pod brojem 2181-147/01/06/LJ.Z.-23-02 te su osobni podatci i sva prava pacijenata zaštićeni sukladno Zakonu o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08) i Zakonu o provedbi Opće uredbe i zaštiti podataka (NN 42/18). Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2913 na koje upućuje Kodeks.

3.4. Postupci istraživanja

Dostupni podatci i nalazi prikupljeni su iz arhive Klinike za neurologiju KBC Split. Ulazni podatci koji su prikupljeni su: spol, godina rođenja i dob dijagnoze, nalaz inicijalno zahvaćene regije tijela, nalazi kliničkih simptoma te dostupni laboratorijski nalazi iz krvi (kreatinin, kreatin kinaza, albumini, lipidi, hemoglobin, glukoza, CRP te elektroliti).

3.5. Statističke metode

Svi prikupljeni podatci uneseni su prvo u tablicu unutar softverskog programa Excel i potom obrađeni u statističkom softverskom paketu SPSS 20.0 (IMB Corp, Armonk, NY).

Kvantitativne podatke prikazali smo pomoću srednjih vrijednosti i standardne devijacije. Kvalitativne podatke prikazali smo u obliku apsolutnih i relativnih brojeva.

Kako bi se ispitalo postoji li statistički značajna povezanost između određenih laboratorijskih nalaza i demografskih varijabli te podataka o raznim simptomima, računali smo koeficijente povezanosti.

Kako bi se provjerilo postoji li statistički značajna razlika između muškaraca i žena u laboratorijskim nalazima, proveli smo Mann-Whitney test.

Za ispitivanje povezanosti između demografskih varijabli (dob pacijenta i dob dijagnoze) i laboratorijskih nalaza bilo je moguće koristiti Pearsonov koeficijent korelacije jer se radi o kontinuiranim varijablama, no bilo je potrebno provjeriti druge preduvjete.

Kako bi se provjerila normalnost distribucije, proveo se Kolmogorov – Smirnovljev (K-S) test te pregled indeksa asimetričnosti i spljoštenosti. S obzirom da kod korištenja K-S testa samo jedan ekstreman rezultat može dovesti do statistički značajnoga rezultata, uz njega smo koristili indekse asimetričnosti i spljoštenosti. Prema unaprijed dogovorenim kriterijima, potrebno je da indeks asimetričnosti bude manji od 3, a indeks spljoštenosti manji od 8 kako bi se distribucije mogle tretirati kao normalne. Pregledom indeksa asimetričnosti i spljoštenosti, bilo je vidljivo da zadovoljavaju navedene uvjete.

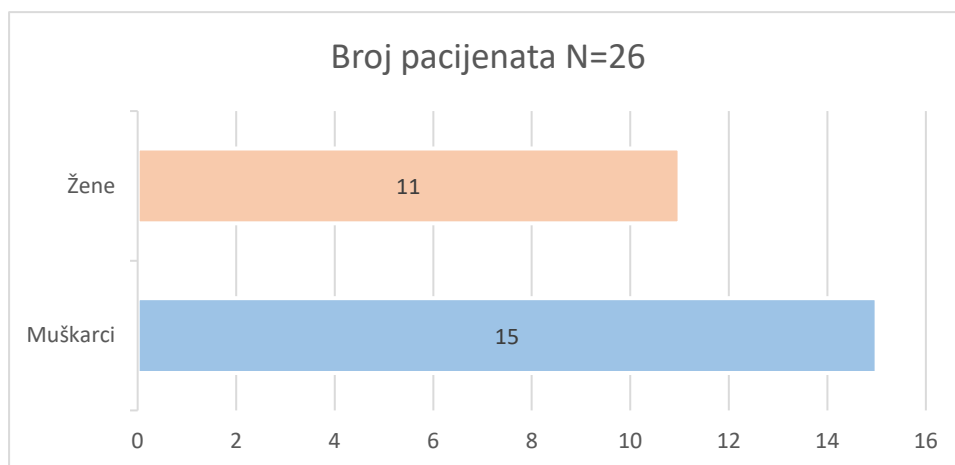
Zatim, provjeravali smo linearnost pregledom Scatter plot dijagrama te je utvrđeno kako među varijablama nema linearne povezanosti, stoga taj uvjet nije zadovoljen za korištenje Pearsonovog koeficijenta povezanosti.

Zbog svega navedenoga, za obradu podataka koristili smo Spearmanov koeficijent korelacije kako bi se ispitala povezanost između varijabli i laboratorijskih nalaza sudionika sa simptomima koji su se javili.

Rezultati su interpretirani na razini značajnosti od $P < 0,05$ te $P < 0,01$ jer su se neke korelacije pokazale značajne na $P < 0,01$.

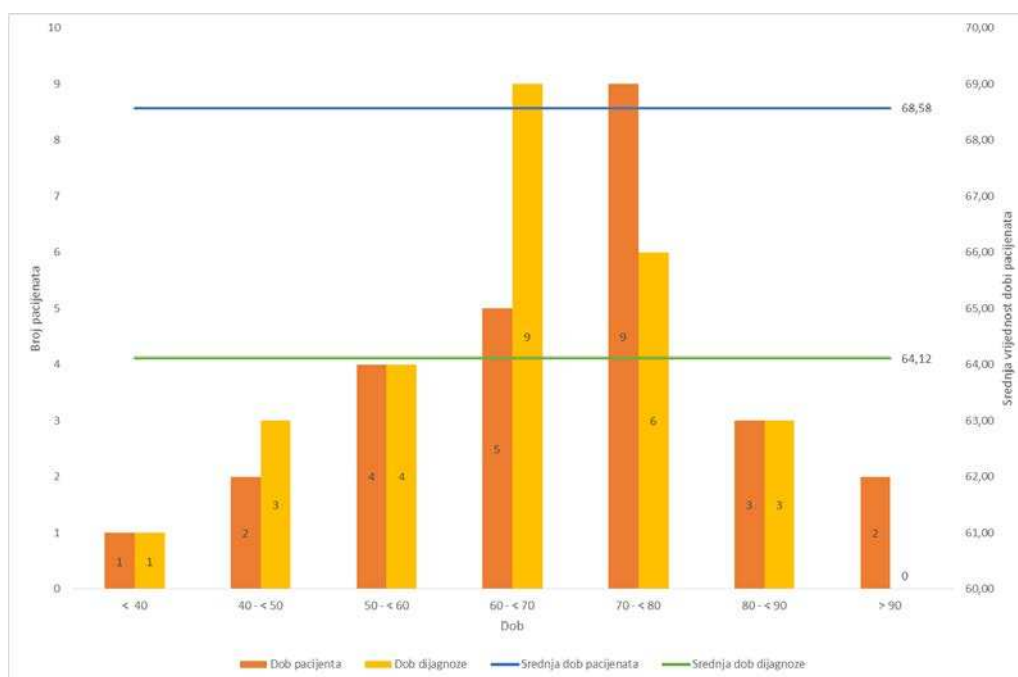
4. REZULTATI

Od ukupnog broja sudionika (N=26), u istraživanju je sudjelovalo 15 (57%) muškaraca i 11 (43%) žena (Slika 5).



Slika 5. Prikaz broja sudionika prema spolu

Dob sudionika i dob pri postavljanju dijagnoze te srednje vrijednosti dobi prikazane su na Slici 6.



Slika 6. Prikaz prosječne dobi sudionika i dobi pri postavljanju dijagnoze

Raspon dobi pacijenata bila je od 37 do 91 godine. Prosječna dob sudionika je $M=68,58$ ($SD=13,79$), dok je prosječna dob u kojoj je postavljena dijagnoza $M=64,12$ ($SD=13,73$).

U Tablici 2 prikazano je koliko je bolesnika imalo određenu kliničku prezentaciju, predominantno zahvaćene GMN/DMN te koliko ih je imalo ekstremitete, bulbarnu muskulaturu ili respiracijsku muskulaturu kao inicijalno zahvaćenu regiju.

Tablica 2. Pojavnost raznih simptoma kod sudionika u istraživanju

| Varijable | DA (N*) | NE (N) | DA (%) | NE (%) |
|------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Dizartriya | 13 | 13 | 50% | 50% |
| Disfagija | 14 | 12 | 53,8% | 46,2% |
| Slabost ekstremiteta | 24 | 2 | 92,3% | 7,7% |
| Hiperrefleksija | 14 | 12 | 53,8% | 46,2% |
| Hiporefleksija | 14 | 12 | 53,8% | 46,2% |
| Dispneja | 6 | 20 | 23,1% | 76,9% |
| Fascikulacije jezika | 10 | 16 | 38,5% | 61,5% |
| Fascikulacije mišića udova | 9 | 17 | 34,6% | 65,4% |
| Pozitivni patološki refleksi | 8 | 18 | 30,8% | 69,2% |
| GMN | 14 | 12 | 53,8% | 46,2% |
| DMN | 24 | 2 | 92,3% | 7,7% |
| Ekstremiteti | 13 | 13 | 50% | 50% |
| Bulbarna muskulatura | 12 | 14 | 46,2% | 53,8% |
| Respiracijska muskulatura | 1 | 25 | 3,8% | 96,2% |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

* broj

Od kliničkih simptoma analizirali smo simptome koji su se repetitivno javljali u većine pacijenata, a to su klinički simptomi oštećenja GMN (hiperrefleksija, pozitivni patološki refleksi) i DMN (dizartrijska, disfagijska, slabost ekstremiteta, hiporefleksija, dispneja te fascikulacije jezika i mišića udova) (Slika 7). Na ukupni broj ispitanika, najčešći simptom koji se javljao u naših ALS bolesnika bio je slabost ekstremiteta (92,3%), dok je najrjeđi bio dispneja (23,1%).

Analizirajući predominantno zahvaćene motoričke neurone, 62% naših ispitanika prezentirala se kombiniranom kliničkom prezentacijom s predominantnim oštećenjem i GMN i DMN. 38% ispitanika prezentirala se oštećenjem isključivo DMN, dok nijedan ispitanik nije imao kliničku prezentaciju izoliranog zahvaćanja GMN.

Od ukupnog broja ispitanika, 13 (50%) ispitanika imalo je ekstremitete kao inicijalno zahvaćenu regiju, 12 (46,2%) je ispitanika imalo bulbarnu regiju te je samo 1 ispitanik (3,8%) imao inicijalno zahvaćenu respiratornu muskulaturu.



Slika 7. Prikaz distribucije kliničkih simptoma

4.1. Rezultati analize laboratorijskih parametara

U Tablici 3 prikazani su deskriptivni podaci za dob sudionika, dob u kojoj je postavljena dijagnoza i za laboratorijske nalaze za sve sudionike. Prikazane su vrijednosti koje su prikupljene za većinu sudionika, dok su neke vrijednosti izbačene iz statističke obrade zbog manjka podataka (albumini i lipidi).

Tablica 3. Deskriptivni podaci za deskriptivne podatke i laboratorijske nalaze

| Varijable | M | SD | Min. ^a | Max. ^b | P* | Indeks asimetričnosti | Indeks spljoštenosti |
|----------------------------------|--------|--------|-------------------|-------------------|-------|--------------------------|-------------------------|
| Dob pacijenta | 68,58 | 23,58 | 37 | 91 | 0,029 | 1,15 | 1,40 |
| Dob dijagnoze | 64,12 | 13,73 | 31 | 86 | 0,200 | 1,16 | 1,46 |
| Kreatinin (μ mol/L) | 60,76 | 13,78 | 39 | 86 | 0,061 | 1,03 | -0,39 |
| Kreatin kinaza (U/L) | 200,50 | 251,30 | 17 | 912 | 0,029 | 1,58 | 2,05 |
| Hemoglobin (g/L) | 139,62 | 18,79 | 85 | 167 | 0,200 | -1,25 | 1,41 |
| Glukoza (mmol/L) | 7,75 | 5,14 | 3.74 | 29.20 | 0,118 | 1,60 | 2,59 |
| Natrij (mmol/L) | 138,72 | 7,21 | 112 | 145 | 0,200 | -1,38 | 1,79 |
| Kalij (mmol/L) | 4,32 | 0,57 | 2.80 | 5.20 | 0,200 | -0,59 | 0,08 |
| C-reaktivni protein (mg/L) | 33,62 | 67,36 | .40 | 245.20 | 0,028 | 1,38 | 0,24 |

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost; standardna devijacija; ili kao brojevi (postotci)

*Kolmogorov – Smirnovljevoj test; značajno uz 5%

^a minimum

^b maksimum

Za 25 ispitanika bila je dostupna dokumentacija o vrijednostima kreatinina. Od ukupnoga broja pacijenata, 11 (44%) ih je imalo snižene vrijednosti kreatinina pri čemu su bile 4 pacijentice, a ostatak su bili muški pacijenti.

Za 14 ispitanika bilo je moguće analizirati vrijednosti kreatin kinaze. 6 je ispitanika (42,9%) imalo povišene razine kreatin kinaze od kojih su 4 bili muškarci, a ostatak žene.

Za obradu vrijednosti albumina bila je dostupna dokumentacija za 12 pacijenata, a za obradu vrijednosti lipida bila je dostupna za svega 5 pacijenata te su stoga ova dva parametra izbačena iz analize.

Svi su pacijenti imali dostupnu dokumentaciju za obradu koncentracija hemoglobina. 7 (26,9%) ih je imalo snižene vrijednosti hemoglobina. 3 su ispitanika bile žene, a 4 muškarci.

Analizirajući razine glukoze za 24 pacijenta, pokazalo se kako je 9 (37,5%) imalo povišene koncentracije, a 1 muški pacijent (4,1%) sniženu koncentraciju glukoze. Od pacijenata koji su imali povišene koncentracije, 7 su bili muški pacijenti, a ostatak su bili ženski pacijenti.

Za natrij i kalij, za svega jednog pacijenta nismo imali dostupne pretrage. 5 (20%) ispitanika imalo je snižene koncentracije natrija od kojih su 4 bili muškarci te 1 žena. 4 (16%) pacijenta su imala snižene vrijednosti kalija od kojih su polovica bili muškarci, a polovica žene. 2 (8%) su muška pacijenta imala povišene vrijednosti kalija.

CRP smo analizirali za 25 pacijenata te ih je 12 (48%) imalo povišene vrijednosti. 8 bolesnika bili su muški pacijenti, a ostatak ženski pacijenti.

U Tablici 4 prikazani su koeficijenti korelacije dobi sudionika i dobi u kojoj je postavljena dijagnoza s laboratorijskim nalazima.

Tablica 4. Korelacijska analiza za dob sudionika i dob dijagnoze s laboratorijskim nalazima

| Varijable | CRE ^a ($\mu\text{mol/L}$) | CK ^b (U/L) | Hb ^c (g/L) | Glu ^d (mmol/L) | Na ^e (mmol/L) | K ^f (mmol/L) | CRP (mmol/L) |
|---------------|---|--------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| Dob sudionika | -0,07 | -0,31 | -0,31 | -0,30 | -0,17 | -0,43 | 0,42 |
| <i>P</i> * | 0,741 | 0,285 | 0,134 | 0,150 | 0,421 | 0,034 | 0,037 |
| Dob dijagnoze | -0,03 | -0,36 | -0,29 | -0,29 | -0,18 | -0,39 | 0,40 |
| <i>P</i> * | 0,897 | 0,211 | 0,145 | 0,176 | 0,281 | 0,052 | 0,046 |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

* Spearmanov koeficijent korelacije; značajno uz 5%

^a kreatinin

^b kreatin kinaza

^c hemoglobin

^d glukoza

^e natrij

^f kalij

Analizom uvodnih varijabli pokazala se statistički značajna negativna srednja povezanost dobi sudionika i razine kalija ($P=0,034$), što znači da su osobe starije životne dobi imale niže razine kalija.

Nadalje, pokazala se značajna pozitivna srednja povezanost dobi sudionika ($P=0,037$) i dobi u kojoj je postavljena dijagnoza ($P=0,046$) s CRP-om. Dakle, osobe starije životne dobi i osobe kojima je u starijoj dobi postavljena dijagnoza, imale su i više razine CRP-a.

U Tablici 5 provjerilo se postoji li statistički značajna razlika između muškaraca i žena u laboratorijskim nalazima.

Tablica 5. Rezultati analize razlike statističke značajnosti između muškaraca i žena u laboratorijskim parametrima

| Varijabla | Varijabla | M | SD | P* |
|------------------------------------|-----------|--------|--------|-------|
| Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$) | Muško | 63,40 | 13,11 | 0,196 |
| | Žensko | 56,80 | 14,49 | |
| Kreatin kinaza (U/L) | Muško | 140,75 | 112,45 | 0,852 |
| | Žensko | 280,17 | 364,92 | |
| Hemoglobin (g/L) | Muško | 142,33 | 19,81 | 0,305 |
| | Žensko | 135,91 | 17,54 | |
| Glukoza (mmol/L) | Muško | 7,98 | 6,11 | 1 |
| | Žensko | 7,36 | 3,22 | |
| Natrij (mmol/L) | Muško | 137,07 | 8,30 | 0,041 |
| | Žensko | 141,20 | 4,47 | |
| Kalij (mmol/L) | Muško | 4,42 | 0,53 | 0,338 |
| | Žensko | 4,16 | 0,62 | |
| C-reaktivni protein (mg/L) | Muško | 49,23 | 82,85 | 0,311 |
| | Žensko | 10,19 | 20,14 | |

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost; standardna devijacija; ili kao brojevi (postotci)
* Mann-Whitney test

Iz Tablice 5 vidljivo je kako se pokazala statistički značajna razlika između muškaraca i žena u razini natrija ($P=0,041$). Pregledom aritmetičkih sredina, vidljivo je kako su žene imale veće razine natrija nego muškarci.

U Tablici 6 prikazana je korelacijska matrica u kojoj je ispitana povezanost između dobi i laboratorijskih nalaza sudionika sa simptomima koji su se javili.

Tablica 6. Korelacijska analiza za demografske varijable, laboratorijske nalaze i simptome

| Varijable | CRE | CK | Hb | Glu | Na | K | CRP |
|---------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|--------------------|----------|------------|
| Dizartrijska | -0,03 | 0,22 | 0,29 | 0,14 | -0,26 | -0,05 | 0,09 |
| <i>P</i> * | 0,895 | 0,461 | 0,147 | 0,518 | 0,202 | 0,812 | 0,654 |
| Disfagija | 0,15 | -0,02 | -0,02 | 0,15 | -0,40 | -0,02 | 0,01 |
| <i>P</i> * | 0,488 | 0,950 | 0,940 | 0,499 | 0,047 | 0,915 | 0,979 |
| Slabost ekstremiteta | 0,17 | - | -0,04 | -0,33 | 0,36 | -0,19 | 0,10 |
| <i>P</i> * | 0,406 | - | 0,852 | 0,119 | 0,075 | 0,377 | 0,627 |
| Hiperrefleksija | 0,27 | 0,04 | -0,26 | -0,07 | 0,15 | -0,20 | -0,29 |
| <i>P</i> * | 0,185 | 0,903 | 0,195 | 0,757 | 0,466 | 0,347 | 0,159 |
| Hiporefleksija | 0,27 | 0,04 | -0,26 | -0,07 | 0,15 | -0,20 | -0,29 |
| <i>P</i> * | 0,185 | 0,903 | 0,195 | 0,757 | 0,466 | 0,347 | 0,159 |
| Dispneja | 0,59 | 0,18 | 0,22 | 0,04 | 0,20 | 0,25 | -0,16 |
| <i>P</i> * | 0,002 | 0,540 | 0,281 | 0,846 | 0,344 | 0,220 | 0,457 |
| Fascikulacije jezika | -0,25 | -0,09 | -0,17 | 0,27 | -0,61 | -0,14 | -0,05 |
| <i>P</i> * | 0,229 | 0,753 | 0,409 | 0,195 | 0,001 [†] | 0,499 | 0,809 |
| Fascikulacije mišića udova | -0,24 | 0,12 | -0,16 | 0,04 | 0,33 | 0,04 | 0,06 |
| <i>P</i> * | 0,242 | 0,689 | 0,445 | 0,862 | 0,103 | 0,847 | 0,763 |
| Pozitivni patološki refleksi | -0,04 | 0,07 | 0,39 | -0,04 | 0,39 | 0,27 | 0,20 |
| <i>P</i> * | 0,860 | 0,808 | 0,049 | 0,854 | 0,055 | 0,187 | 0,328 |

| Varijable | CRE | CK | Hb | Glu | Na | K | CRP |
|------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|------------|
| GMN | -0,04 | 0 | 0,31 | -0,19 | 0,27 | -0,06 | 0,04 |
| <i>P</i> * | 0,833 | 1 | 0,124 | 0,380 | 0,192 | 0,771 | 0,833 |
| DMN | 0,14 | -0,03 | -0,30 | 0,05 | -0,09 | -0,16 | -0,34 |
| <i>P</i> * | 0,499 | 0,907 | 0,138 | 0,834 | 0,683 | 0,456 | 0,097 |
| Ekstremiteti | -0,13 | 0,28 | -0,08 | 0 | 0,23 | -0,13 | -0,02 |
| <i>P</i> * | 0,525 | 0,337 | 0,708 | 1 | 0,268 | 0,524 | 0,916 |
| Bulbarna muskulatura | 0,03 | -0,39 | 0,01 | -0,07 | -0,32 | 0,03 | 0,02 |
| <i>P</i> * | 0,895 | 0,163 | 0,960 | 0,757 | 0,118 | 0,874 | 0,916 |
| Respiracijska muskulatura | 0,27 | 0,24 | 0,17 | 0,17 | 0,23 | 0,26 | 0 |
| <i>P</i> * | 0,193 | 0,407 | 0,396 | 0,439 | 0,270 | 0,218 | 1 |

Rezultati su prikazani kao brojevi (postotci)

*Spearmanov koeficijent korelacije; značajno uz 5%

†Spearmanov koeficijent korelacije; značajno uz 1%

Iz rezultata u Tablici 6 vidljivo je kako postoji nekoliko statistički značajnih rezultata.

Analizom parametara pokazala se statistički značajna pozitivna niska povezanost razine hemoglobina i pozitivnih patoloških refleksa ($P=0,049$), što znači da su osobe s višom razinom hemoglobina imali i više simptoma pozitivnih patoloških refleksa.

Analizom elektrolita pokazala se statistički značajna negativna srednja povezanost natrija s disfagijom ($P=0,047$) i fascikulacijom jezika ($P=0,001$), što podrazumijeva da osobe s nižom razinom natrija, imaju više spomenutih simptoma.

5. RASPRAVA

Amiotrofična lateralna skleroza bolest je s izrazito heterogenom kliničkom prezentacijom. Sve do danas, ne postoji jedinstveni laboratorijski parametar kojim bi se sa sigurnošću mogla postaviti dijagnoza niti procijeniti težina bolesti, stoga je postavljanje dijagnoze ALS-a posebno izazovno. Dijagnoza ALS-a, primarno se postavlja na temelju kliničke prezentacije i uz pomoć ostalih pretraga, u prvom redu EMG-a i MR-a. Osnovni cilj ovoga istraživanja bio je prikazati obilježja laboratorijskih parametara koji se analiziraju rutinski u sklopu obrade pacijenata pri prijemu te pokušati utvrditi povezanost laboratorijskih parametara s demografskim varijablama i kliničkom prezentacijom u oboljelih od ALS-a.

Osnovne demografske varijable, kao što su spolna distribucija i dob pri postavljanju dijagnoze, relativno se podudaraju s podacima opisanima u literaturi (49,50). 43% naših ispitanika bile su žene, dok su 57% bili muškarci. Hertel i sur. imali su 42% ženskih ispitanika, dok su ostatak bili muškarci (49), što je sličan rezultat kao u ovom istraživanju. U našem istraživanju, srednja dob postavljanja dijagnoze je bila 64,12 što je kasnije od srednje dobi postavljanja dijagnoze u istraživanju Hertel i sur. (49), ali ranije nego što je to opisano u istraživanju Sun i sur., pri čemu je srednja dob postavljanja dijagnoze bila 66,25 (50).

Danas, obzirom na bolje preživljenje oboljelih od ALS-a kao posljedica sve inovativnijih terapijskih pristupa, rano postavljanje sumnje na ALS od velike je važnosti. Pri inicijalnoj prezentaciji bolesti, u većini je slučajeva nažalost gotovo nemoguće postaviti dijagnozu zbog izrazito heterogene kliničke slike. Najčešći simptom koji se javljao u naših ALS bolesnika bio je slabost ekstremiteta (92,3%), dok je najrjeđi bio dispneja (23,1%). Ovi se nalazi podudaraju s literaturom koja navodi slabost udova kao najčešći simptom te dispneju kao najrjeđi obzirom da se respiratorna insuficijencija uobičajeno javlja u terminalnim stadijima bolesti (3,7,12).

62% naših ispitanika prezentiralo se kombiniranom kliničkom slikom s predominantnim oštećenjem i GMN i DMN, 38% ispitanika prezentiralo se oštećenjem isključivo DMN, dok nijedan ispitanik nije imao kliničku prezentaciju izoliranog zahvaćanja GMN. Dobivena distribucija, osim kliničke prezentacije oštećenja i GMN i DMN, razlikuje se od literature, gdje je manji dio pacijenata (11,6%) imalo isključivo kliničku sliku oštećenja DMN te 1,4% isključivo prezentacije oštećenja GMN (49). Moguće objašnjenje za ovakvu distribuciju je da je naše istraživanje imalo svega 26 pacijenata, dok su Hertel i sur. imali 1084 pacijenata te su se mogli obuhvatiti i pacijenti s rjeđom kliničkom prezentacijom, kao što je izolirano zahvaćanje DMN ili GMN.

U našem istraživanju od ukupnog broja ispitanika, 50% ispitanika imalo je ekstremitete kao inicijalno zahvaćenu regiju te 46,2% ispitanika je imalo inicijalno bulbarne simptome. Ovi se nalazi razlikuju od nalaza istraživanja Hertel i sur., u kojem je 70,5% ispitanika imalo udove kao ishodno zahvaćenu regiju, a 25,7% bulbarnu muskulaturu (49). Što se tiče respiracijske muskulature kao inicijalno zahvaćene regije, rezultat je sličan u našem istraživanju i istraživanju Hertel. i sur., pri čemu se 3,8% naših pacijenata javilo sa simptomima respiratorne insuficijencije kao primarnog simptoma, a u istraživanju Hertel i sur. respiratornu insuficijenciju imalo je 2,6% ispitanika (49).

Provedeno je istraživanje koje je pokazalo kako se povećane koncentracije kreatinina povezuju s muškim spolom, starijom dobi pri postavljanju dijagnoze te izostankom kliničke prezentacije u vidu predominantnog zahvaćanja DMN-a (49). Ovim istraživanjem je pokazano kako su pacijenti koji su imali odstupanja u razinama kreatinina, imali snižene, a ne povišene razine kreatinina (44%). Od 11 pacijenata koji su imali snižene razine kreatinina, 4 su bile pacijentice, a ostatak muški pacijenti. Sun i sur. (50) pokazali su kako se snižene koncentracije kreatinina povezuju s većim mortalitetom i težom kliničkom slikom, zahvaćajući i GMN i DMN. Ovu tvrdnju potvrđuju i druga istraživanja (51,52), ali analizom podataka nismo pronašli nikakvu povezanost sniženih koncentracija kreatinina s istim varijablama.

Iz našeg istraživanja vidljivo je kako je 42,9% ispitanika imalo povišene razine kreatin kinaze od kojih su 4 bili muškarci, a ostatak žene. Hertel i sur. (49) su u svom istraživanju utvrdili statističku povezanost povišenih razina kreatin kinaze s muškim spolom, postavljanjem dijagnoze u mlađoj dobi te predominantnim znakovima oštećenja DMN, no mi nismo pronašli nikakvu povezanost promjena kreatin kinaze s tim parametrima.

Laboratorijski parametri poput albumina i lipida, nisu se mogli analizirati zbog nedostatka podataka iz arhive koji bi se koristili za statističku analizu te zbog tog razloga nismo bili u mogućnosti dovesti zaključke i usporedbe s literaturom.

Analizom povezanosti elektrolita s uvodnim parametrima, pokazala se statistički značajna povezanost između spola i razine natrija ($P=0,041$) te se veća razina natrija pokazala u žena. Isto tako, pokazala se statistički značajna negativna povezanost natrija s disfagijom ($P=0,047$) i fascikulacijama jezika ($P=0,001$), što znači da su osobe s nižom razinom natrija imale više spomenutih simptoma. Što se tiče kalija, analizom se pokazala statistički značajna negativna povezanost dobi sudionika i razine kalija ($P=0,034$), što znači da su osobe starije životne dobi imale niže razine kalija. Sun i sur. istraživali su povezanost natrija i kalija s ALS-om te nisu ustanovili statističku povezanost navedenih elektrolita s našim varijablama (50).

Daljnjom analizom pokazala se statistički značajna pozitivna niska povezanost razine hemoglobina i pozitivnih patoloških refleksa ($P=0,049$), što upućuje na predominantno zahvaćanje GMN u osoba s višom razinom hemoglobina. Povezanost hemoglobina s ALS-om istraživali su također Sun i sur. (50), ali nisu ustanovili povezanost hemoglobina s ALS-om.

Pretraživanjem baze podataka, nije pronađena dodatna literatura koja bi mogla objasniti rezultate ovog istraživanja za natrij, kalij i hemoglobin, stoga su potrebna dodatna ispitivanja kako bi se mogli donijeti sigurni zaključci o povezanosti istih s ALS-om.

Analizirajući podatke o nalazima glukoze naših pacijenata, nismo ustanovili nikakvu povezanost promjena koncentracije glukoze s dobi, spolom i kliničkom prezentacijom. 34,6% naših pacijenata imalo je povećane razine glukoze. Neka istraživanja navode povezanost povećane razine glukoze s većim mortalitetom i težom kliničkom prezentacijom ALS bolesnika (50,53).

Od ukupnog broja ispitanika, 46,1% ih je imalo povećane razine CRP-a. Nadalje, istraživanjem se pokazala značajna pozitivna povezanost dobi sudionika ($P=0,037$) i dobi u kojoj je postavljena dijagnoza ($P=0,046$) s CRP-om tako da su osobe starije životne dobi i osobe kojima je u starijoj dobi postavljena dijagnoza, imale su i više razine CRP-a. Pretraživanjem literature u bazi podataka nismo pronašli radove kojima bismo mogli objasniti ove nalaze. Nekolicina radova pokazala su povezanost povećanih koncentracija CRP-a s težinom kliničke prezentacije (50,54).

Analizirajući povezanost laboratorijskih parametara iz krvi s uvodnim parametrima kao što su spol, dob pri postavljanju dijagnoze te klinička prezentacija, ovim istraživanjem pokazali su se vrlo nespecifični rezultati. Kakogod, od velike je potrebe naglasiti da je ovo istraživanje imalo brojna ograničenja. Baza podataka s literaturom koja je provodila relativno slična istraživanja, bila je ograničena pristupom kao i brojem istraživanja koji su analizirali slične povezanosti laboratorijskih parametara s ALS-om, a koja bi se mogla uzeti za usporedbu rezultata ovog istraživanja. Isto tako, važno je napomenuti da je uzorak ispitanika koji su analizirani u KBC Split malen, te su potrebne dodatne studije i opsežnija dokumentacija kako bi se mogli izvesti sigurniji zaključci o povezanosti promjena u laboratorijskim parametrima iz krvi s ALS-om.

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata koji su dobiveni ovim istraživanjem, moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. U pacijenata oboljelih od ALS-a mogu se vidjeti nespecifična odstupanja u laboratorijskim parametrima;
2. Za sada ne postoji nikakva sigurna statistički značajna povezanost rutinskih laboratorijskih parametara sa spolom, dobi pri postavljanju dijagnoze te kliničkom prezentacijom ALS-a;
3. Laboratorijski parametri (kreatinin, kreatin kinaza, albumini, lipidi, elektroliti, hemoglobin i CRP) za sada se ne mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri za ALS.

7. LITERATURA

1. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. Proučavanje živčanog sustava. U: Heffer M, Puljak L, Kostić S, ur. Neuroznanost. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 4-14.
2. Aminoff MJ, Greenberg DA, Simon RP. Motor deficits: Approach to diagnosis. U: Foltin J, Fernando N, ur. Clinical neurology. Šesto izdanje. London: McGraw-Hill Medical; 2012. str. 153.
3. Habek M, Brinar V. Motoričke funkcije. U: Brinar V, urednik. Neurologija za medicinare. Drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 16-9.
4. Aminoff MJ, Greenberg DA, Simon RP. Motor deficits: Anterior horn cell disorders. U: Foltin J, Fernando N, ur. Clinical neurology. Šesto izdanje. London: McGraw-Hill Medical; 2012. str. 174-6.
5. Habek M, Brinar V. Neuromuskularne bolesti. U: Brinar V, urednik. Neurologija za medicinare. Drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 414-8.
6. Corcia P, Lunetta C, Vourc'h P, Pradat PF, Blasco H. Time for optimism in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J neurol.* 2023. doi: 10.1111/ene.15738. [Epub ahead of print].
7. Bučuk M, Dijan K, Tomić Z, Sonnenschein I. Amiotrofična lateralna skleroza. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis [Internet].* Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2014. [citirano 28.03.2023.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:653898>.
8. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(5):771-6. doi: 10.1097/WCO.0000000000000730.
9. Mitrečić D, Bilić E, Gajović S. How Croatian patients suffering from amyotrophic lateral sclerosis have been turned into medical tourists - a comment on a medical and social phenomenon. *Croat Med J.* 2014;55(5):443-5. doi: 10.3325/cmj.2014.55.443.
10. Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology.* 2009;73(20):1693-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c1df48.
11. Bilić H, Petrović M. Kognitivna funkcija u osoba oboljelih od amiotrofične lateralne skleroze. U: Bilić E, urednik. Smjernice za liječenje neuromuskularnih bolesti – 2. dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2022. str. 107-13.
12. Bilić E, Sitaš B, Borovečki F, Pavliša G, Zemba Čilić A. Terapijski pristupi osobama oboljelim od amiotrofične lateralne skleroze. Od razgovora do lijekova. U: Bilić E, urednik. Smjernice za liječenje neuromuskularnih bolesti – 1. dio. Zagreb: Medicinska naklada; 2021. str. 137-63.

13. Babić Leko M, Župunski V, Kirincich J, Smilović D, Hortobágyi T, Hof PR i sur. Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Behav Neurol*. 2019;2019:2909168. doi: 10.1155/2019/2909168.
14. Braems E, Swinnen B, Van Den Bosch L. C9orf72 loss-of-function: a trivial, stand-alone or additive mechanism in C9 ALS/FTD?. *Acta Neuropathol*. 2020;140:625-43. doi: 10.1007/s00401-020-02214-x.
15. Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(9):544-58. doi: 10.1038/s41582-018-0047-2.
16. Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci*. 2008;13:867-78. doi: 10.2741/2727.
17. Efimova AD, Ovchinnikov RK, Roman AY, Maltsev AV, Grigoriev VV, Kovrazhkina EA i sur. [The FUS protein: Physiological functions and a role in amyotrophic lateral sclerosis]. *Mol Biol (Mosk)*. 2017;51(3):387-99. doi: 10.7868/S0026898417020094.
18. Oskarsson B, Horton DK, Mitsumoto H. Potential environmental factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin*. 2015;33(4):877-88. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.009.
19. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203.
20. Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(11-12):1068-82. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.05.002.
21. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. Pokret i njegov središnji nadzor: Neuronski krug donjeg motoneurona i motorički nadzor. U: Heffer M, Puljak L, Kostić S, ur. *Neuroznanost*. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 373.
22. Guo C, Ma YY. Calcium Permeable-AMPA Receptors and excitotoxicity in neurological disorders. *Front Neural Circuits*. 2021;15:711564. doi: 10.3389/fncir.2021.711564.
23. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: Where are we now? *Front Neurosci*. 2019;13:1310. doi: 10.3389/fnins.2019.01310.

24. Cunha-Oliveira T, Montezinho L, Mendes C, Firuzi O, Saso L, Oliveira PJ. Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis: Pathophysiology and opportunities for pharmacological intervention. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5021694. doi: 10.1155/2020/5021694.
25. Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(6):777-94. doi: 10.1007/s00401-013-1125-6.
26. Baradaran-Heravi Y, Van Broeckhoven C, van der Zee J. Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiol Dis*. 2020;134:104639. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104639.
27. Kelaini S, Chan C, Cornelius VA, Margariti A. RNA-Binding proteins hold key roles in function, dysfunction, and disease. 2021;10(5):366. doi: 10.3390/biology10050366.
28. Grad LI, Rouleau GA, Ravits J, Cashman NR. Clinical spectrum of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(8):a024117. doi: 10.1101/cshperspect.a024117.
29. Turner MR; UK MND Clinical studies group. Diagnosing ALS: the Gold Coast criteria and the role of EMG. *Pract Neurol*. 2022;22(3):176-8. doi: 10.1136/practneurol-2021-003256. [Epub 2022 Jan 6].
30. Pradat PF, Bruneteau G. Quels sont les diagnostics différentiels et les formes frontières de SLA? [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Rev Neurol*. 2006;162 Spec No 2:4S81-4S90.
31. Magistris MR. Sclérose latérale amyotrophique: diagnostic différentiel et formes frontières [Amyotrophic lateral sclerosis: differential diagnosis and frontier forms]. *Rev Neurol*. 2006;162 Spec No 2:4S67-4S80.
32. Singh N, Ray S, Srivastava A. Clinical mimickers of amyotrophic lateral sclerosis-conditions we cannot afford to miss. *Ann Indian Acad Neurol*. 2018;21(3):173-8. doi: 10.4103/aian.AIAN_491_17.
33. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, Nakanishi A. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci*. 1999 Oct;169(1-2):13-21. doi: 10.1016/s0022-510x(99)00210-5.
34. Hulisz D. Amyotrophic lateral sclerosis: disease state overview. *Am J Manag Care*. 2018;24(15 Suppl):S320-S326.

35. Fang T, Al Khleifat A, Meurgey JH, Jones A, Leigh PN, Bensimon G i sur. Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study. *Lancet Neurol.* 2018;17(5):416-22. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30054-1.
36. Karam CY, Paganoni S, Joyce N, Carter GT, Bedlack R. Palliative care issues in amyotrophic lateral sclerosis: An evidenced-based review. *Am J Hosp Palliat Care.* 2016;33(1):84-92. doi: 10.1177/1049909114548719. [Epub 2014 Sep 8].
37. Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol.* 2014;13(11):1127-38. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70129-2.
38. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V, Malaspina A. Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Ann Neurol.* 2018;84(1):130-9. doi: 10.1002/ana.25276. [Epub 2018 Aug 16].
39. Miller T, Cudkowicz M, Shaw PJ, Andersen PM, Atassi N, Bucelli RC i sur. Phase 1-2 trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med.* 2020;383(2):109-19. doi: 10.1056/NEJMoa2003715.
40. Miller TM, Cudkowicz ME, Genge A, Shaw PJ, Sobue G, Bucelli RC i sur. Trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med.* 2022;387(12):1099-110. doi: 10.1056/NEJMoa2204705.
41. van Eijk RPA, Eijkemans MJC, Nikolakopoulos S, Jansen MD, Westeneng HJ, van Eijk KR i sur. Pharmacogenetic interactions in amyotrophic lateral sclerosis: a step closer to a cure? *Pharmacogenomics J.* 2020;20(2):220-6. doi: 10.1038/s41397-019-0111-3. [Epub 2019 Oct 17].
42. Benditt JO. Full-time noninvasive ventilation: possible and desirable. *Respir Care.* 2006;51(9):1005-12; discussion 1012-5.
43. Pavliša G, Bulat Kardum Lj, Puretić H, Žuljević E, Stipić-Marković A, Barković I i sur. Smjernice za neinvazivnu mehaničku ventilaciju pri liječenju kronične respiracijske insuficijencije. *Liječ Vjesn.* 2018; 140:1-6. doi:10.26800/LV-140-1-2-1.
44. Pinto AC, Evangelista T, Carvalho M, Alves MA, Sales Luís ML. Respiratory assistance with a non-invasive ventilator (Bipap) in MND/ALS patients: survival rates in a controlled trial. *J Neurol Sci.* 1995;129 Suppl:19-26. doi: 10.1016/0022-510x(95)00052-4.

45. Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ, Gibson GJ. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2006;5(2):140-7. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70326-4.
46. Radunovic A, Annane D, Rafiq MK, Mustafa N. Mechanical ventilation for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(3):CD004427. doi: 10.1002/14651858.CD004427.pub3. [Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Oct 06;10 :CD004427].
47. Bourke SC, Bullock RE, Williams TL, Shaw PJ, Gibson GJ. Noninvasive ventilation in ALS: indications and effect on quality of life. *Neurology.* 2003;61(2):171-7. doi: 10.1212/01.wnl.0000076182.13137.38.
48. Garuti G, Rao F, Ribuffo V, Sansone VA. Sialorrhea in patients with ALS: current treatment options. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2019;9:19-26. doi: 10.2147/DNND.S168353.
49. Hertel N, Kuzma-Kozakiewicz M, Gromicho M, Grosskreutz J, de Carvalho M, Uysal H i sur. Analysis of routine blood parameters in patients with amyotrophic lateral sclerosis and evaluation of a possible correlation with disease progression-a multicenter study. *Front Neurol.* 2022;13:940375. doi: 10.3389/fneur.2022.940375.
50. Sun J, Carrero JJ, Zagai U, Evans M, Ingre C, Pawitan Y, Fang F. Blood biomarkers and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2020;27(11):2125-33. doi: 10.1111/ene.14409. [Epub 2020 Jul 12].
51. Lanznaster D, Bejan-Angoulvant T, Patin F, Andres CR, Vourc'h P, Corcia P i sur. Plasma creatinine and amyotrophic lateral sclerosis prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2019;20(3-4):199-206. doi: 10.1080/21678421.2019.1572192. [Epub 2019 Apr 9].
52. Chiò A, Calvo A, Bovio G, Canosa A, Bertuzzo D, Galmozzi F i sur. Amyotrophic lateral sclerosis outcome measures and the role of albumin and creatinine: a population-based study. *JAMA Neurol.* 2014;71(9):1134-42. doi: 10.1001/jamaneurol.
53. Wuolikainen A, Jonsson P, Ahnlund M, Antti H, Marklund SL, Moritz T i sur. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Mol Biosyst.* 2016;12(4):1287-98. doi: 10.1039/c5mb00711a. [Epub 2016 Feb 17].

54. Staats KA, Borchelt DR, Tansey MG, Wymer J. Blood-based biomarkers of inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener.* 2022;17(1):11. doi: 10.1186/s13024-022-00515-1.

8. SAŽETAK

Ciljevi: Glavni cilj ovog istraživanja bilo je prikazati promjene u rutinskim laboratorijskim pretragama iz krvi te ispitati povezanost tih promjena s demografskim varijablama i kliničkom prezentacijom oboljelih od ALS-a.

Ispitanici i postupci: Istraživanje je provedeno u Klinici za neurologiju KBC Split u obliku retrospektivnog kohortnog istraživanja. U ispitivanje je bilo uključeno 26 pacijenata oboljelih od ALS-a s nalazima laboratorijskih parametara iz krvi koji su rutinski izvađeni u svrhu obrade pacijenta. Podatci su prikupljeni iz arhive Klinike za neurologiju KBC Split iz razdoblja 2017.-2021. Prikupljeni nalazi uključivali su podatke o spolu, dobi, dobi pri postavljanju dijagnoze, inicijalno zahvaćenu regiju tijela, kliničkoj prezentaciji te podatke o laboratorijskim nalazima iz krvi. Dobiveni rezultati prikazani su uz pomoć apsolutnih i relativnih brojki, a statistička je povezanost interpretirana na razini značajnosti od $P<0,05$ i $P<0,01$.

Rezultati: U ovom istraživanju sudjelovalo je 15 (57%) muškaraca i 11 (43%) žena. Raspon dobi pacijenata bila je od 37 do 91 godine. Prosječna dob sudionika bila je 68,58 dok je prosječna dob u kojoj je postavljena dijagnoza bila 64,12. Najčešći simptom koji se javljao u naših ALS bolesnika bio je slabost ekstremiteta (92,3%), dok je najrjeđi bio dispneja (23,1%). 62% naših ispitanika prezentirala se kombiniranom kliničkom prezentacijom s predominantnim oštećenjem i GMN i DMN. 38% ispitanika prezentirala se oštećenjem isključivo DMN, dok nijedan ispitanik nije imao kliničku prezentaciju izoliranog zahvaćanja GMN. 50% ispitanika imalo je ekstremitete kao inicijalno zahvaćenu regiju te 46,2% ispitanika je imalo bulbarnu regiju, dok je samo 1 ispitanik 3,8% imao inicijalno zahvaćenu respiratornu muskulaturu. Analizom se pokazala se statistički značajna povezanost dobi sudionika i razine kalija ($P=0,034$) te povezanost dobi sudionika ($P=0,037$) i dobi u kojoj je postavljena dijagnoza ($P=0,046$) s CRP-om. Istraživanjem se pokazala statistički značajna razlika između muškaraca i žena u razini natrija ($P=0,041$) te su žene imale veće razina natrija. Analizom hemoglobina pokazala se statistički značajna povezanost razine hemoglobina i pozitivnih patoloških refleksa ($P=0,049$). Analizom razina natrija se pokazala statistički značajna povezanost natrija s disfagijom ($P=0,047$) i fascikulacijom jezika ($P=0,001$).

Zaključci: U pacijenata oboljelih od ALS-a mogu se vidjeti nespecifična odstupanja u laboratorijskim parametrima. Ovim istraživanjem nije utvrđena specifična povezanost rutinskih laboratorijskih parametara sa spolom, dobi pri postavljanju dijagnoze i kliničkom prezentacijom ALS-a. Laboratorijski parametri (kreatinin, kreatin kinaza, albumini, lipidi, elektroliti, hemoglobin i CRP) za sada se ne mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri za ALS te su zbog brojnih ograničenja ovog istraživanja nužna daljnja istraživanja.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Analysis of laboratory parameters in patients with amyotrophic lateral sclerosis in University Hospital of Split over a five-year period

Objectives: The main aim of this study was to show changes in routine blood laboratory tests and to examine the association of these changes with demographic variables and clinical presentation of ALS patients.

Subjects and methods: The research was conducted in Department of Neurology at University Hospital of Split in the form of a retrospective cohort study. The study included 26 ALS patients with blood laboratory parameters that were routinely taken for the purpose of patient treatment. The data were collected from the archives of the Department of neurology at University Hospital of Split from the period of 2017 to 2021. The collected findings included data on gender, age, age at diagnosis, initially affected body region, clinical presentation and data about blood laboratory findings. The obtained results were presented with the help of absolute and relative numbers, and the statistical association was interpreted at the significance level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

Results: 15 (57%) men and 11 (43%) women participated in this research. The age range of the patients was from 37 to 91 years. The average age of the participants was 68.58, while the average age at diagnosis was 64.12. The most common symptom that occurred in our ALS patients, it was limb weakness (92.3%), while dyspnea was the least common (23.1%). 62% of our subjects presented with a combined clinical presentation with predominant damage to both GMN and DMN. 38% of respondents presented with damage exclusively to the DMN, while no subject had a clinical presentation of isolated GMN involvement. 50% of subjects had extremities as the initially affected region and 46.2% of subjects had bulbar region, while only 1 subject 3.8% had respiratory musculature initially affected. The analysis showed a statistically significant association between the participant's age and potassium level ($P=0.034$) and the association between the participant's age ($P=0.037$) and the age at which the diagnosis was made ($P=0.046$) with CRP. The research showed a statistically significant difference between men and women in sodium levels ($P=0.041$), and women had higher sodium levels. Analysis of hemoglobin showed a statistically significant association between hemoglobin level and positive pathological reflexes ($P=0.049$). Analysis of sodium levels showed a statistically significant association of sodium with dysphagia ($P=0.047$) and tongue fasciculation ($P=0.001$).

Conclusions: Non-specific abnormalities in laboratory parameters can be observed in ALS patients. This research has not determined the specific association of routine laboratory parameters with gender, age at diagnosis and clinical presentation of ALS. Laboratory parameters (creatinine, creatine kinase, albumins, lipids, electrolytes, hemoglobin and CRP) cannot currently be used as potential biomarkers for ALS, and due to numerous limitations of this study, further research is necessary.