



**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**NUSİNERSEN TEDAVİSİ ALAN ERİŞKİN SPİNAL MUSKÜLER
ATROFİ (SMA) HASTALARINDA İNFLAMASYON VE GLİAL
HÜCRE İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN TESPİTİ**

Dr. Doruk ARSLAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2023**



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**NUSİNERSEN TEDAVİSİ ALAN ERİŞKİN SPİNAL MUSKÜLER
ATROFİ (SMA) HASTALARINDA İNFLAMASYON VE GLİAL
HÜCRE İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN TESPİTİ**

Dr. Doruk ARSLAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Can Ebru KURT**

**ANKARA
2023**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecimin her aşamasında yardımını ve desteğini hissettiren ve yine her aşamasında değerli fikirleri ve vizyonu ile beni yönlendiren, beraber çalışmaktan ve tez öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım Prof. Dr. Can Ebru Kurt'a,

Her zaman bir ailenin parçası olarak hissetmemi sağlayan, hem akademik hem de manevi kazanımlarım nedeniyle hayat boyu minnettar olacağım Nöromusküler Hastalıklar Grubu'nun değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Ersin Tan ve Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini asla esirgemeyen, hep daha iyi bir hekim olabilmem amacıyla destek olan, Türk Nöroloji Derneği başkanı Prof. Dr. M. Akif Topçuoğlu'na ve üniversitemiz Nöroloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. E. Murat Arsava'ya,

Uzmanlık eğitimi sürecim boyunca iyi bir nöroloji hekimi yetiştirme gayesiyle desteklerini esirgemeyen saygıdeğer Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve zorlu asistanlık sürecimi kolaylaştıran, beraber çalışmaktan keyif aldığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma (ek olarak beş yıl boyunca hep yanımda olan kıdemlilerim Cansu Ayvacioğlu Çağan'a ve Okan Sökmen'e),

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım Dr. Öğr. Gör. Zeynep Ergül Ülger'e, deneylere katkılarından dolayı Sibel Gökşen'e, veri toplanmasına katkılarından dolayı Berin İnan'a, ölçeklerin analizi için Prof. Dr. Muhammed Kılınç'a ve çalışmaya kazandırdığı farklı bir bakış açısı için Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya,

Hayat boyu yanımda olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen canım dostlarım Aslı Demircioğlu, Batuhan-Ayşen Aslan, Mert-Simge Polat, Umut Gökhan Özdemir, Burcu Azap ve dostluğumuzu artık bir de komşuluğumuzla pekiştirdiğimiz Ceyhun-Ezgi Üstün'e; attığım her adımda yanımda olan ve varlığı ile bana güven veren canım kardeşim Umut Altaş'a,

Beni sevgiyle büyüten, bugünlere gelmemde en az benim kadar emekleri olan ve iyi bir hekim olma yolunda bana en büyük desteği veren sevgili annem Nilay Moramullu Arslan ve sevgili babam Levent Arslan'a,

Elmanın bir diğer yarısı canım eşim Başak Sayınalp Arslan'a ve bu süreçte heyecanlı bir bekleyişe yol açan Alp Dora Arslan'a sonsuz teşekkürlerimle ...

Dr. Doruk ARSLAN

ÖZET

Arslan, D., Nusinersen Tedavisi Alan Erişkin Spinal Musküler Atrofi (SMA) Hastalarında İnflamasyon ve Glial Hücre İlişkili Biyobelirteçlerin Tespiti, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023.

Spinal musküler atrofi (SMA), ilerleyici motor nöron kaybı ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Günümüzde, SMA patogenezinin sadece motor nöron dejenerasyonu ile kısıtlı olmadığı, başta glial hücreler ve nöroinflamasyon olmak üzere birçok farklı hücre ve doku tipinin sürece katkı sağladığı düşünülmektedir. Nusinersen, ülkemizde onaylanmış tek tedavi seçeneğidir. Bu çalışmada, glial hücre ve nöroinflamasyon ilişkili moleküllerin sürece katkısını tanımlamak ve tanısal ve/veya tedavi yanıtını değerlendiren biyobelirteçler saptamak amaçlanmıştır. Nusinersen tedavisi alan 24 erişkin SMA hastası ve 12 kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Glial hücre ilişkili olan (GFAP ve GDNF) ve nöroinflamatuvar etkinlik gösteren (YKL-40 ve IL-6) dört molekül seçilerek, bu moleküllerin beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerindeki düzeyleri, hastalarda nusinersen tedavisi öncesi ve tedavinin 15. ayında değerlendirilmiştir. Ayrıca, kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar sonucu patogeneze olan katkıları tartışılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla SMA hastalarının GFAP ve IL-6 seviyeleri yüksek ($p < 0,05$) ve GDNF düzeyi düşüktür ($p < 0,05$). ROC eğrisi analizlerinde GFAP molekülünün tanısal karar verdiriciliği, sınır $\geq 6,12$ ng/ml alındığında, %87,5 duyarlılık ve %100 özgüllüktedir. Farklı biyomolekül değerleri (GFAP, GDNF ve YKL-40) birleştirilerek oluşturulan lojistik regresyon modelinde ise eğri altında kalan alan 1,0 değerine ulaşmıştır ($p < 0,001$). Tedavi altında IL-6 ve YKL-40 düzeyleri azalmış olup; GDNF düzeylerinde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Yüksek BOS GFAP seviyeleri daha iyi klinik sonlanım ile ilişkilendirilmiştir ($OR = 0,624$, $p < 0,05$). Bulgular, glial hücrelerin ve nöroinflamatuvar değişikliklerin SMA patogenezinin katkısını doğrular. GFAP, SMA hastalığı hem tanısal hem de prognostik önemi olan bir belirteçtir ve yüksek seviyeleri daha iyi klinik sonlanımla ilişkilidir. Glial hücrelere yönelik yeni tedaviler ve anti-inflamatuvar ajanlar mevcut tedavilerin klinik faydası üzerine olumlu etki yapabilir.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, nusinersen, astrosit, GFAP, nöroinflamasyon

ABSTRACT

Arslan, D., Evaluation of Inflammatory and Glial Cell-related Biomarkers in Adults with Spinal Muscular Atrophy (SMA) under Nusinersen Treatment, Hacettepe University, Thesis in Neurology, Ankara, 2023. Spinal muscular atrophy (SMA) is an inherited disease characterized by progressive loss of motor neurons affecting anterior horn cells of the spinal cord and brainstem motor nuclei. It is thought that the pathogenesis of SMA is not limited to motor neuron degeneration, but many different cell and tissue types, especially glial cells, and neuroinflammation contribute to the process as well. Nusinersen is the only approved treatment option in Turkey. In this study, it was aimed to examine the contribution of glial cell and neuroinflammation-related molecules to the process and to identify biomarkers related to diagnosis and/or treatment response. Accordingly, 24 adult SMA patients receiving nusinersen therapy and 12 controls were included in the study. Four molecules associated with glial cells (GFAP and GDNF) and neuroinflammatory activity (YKL-40 and IL-6) were selected, and levels of these molecules in cerebrospinal fluid (CSF) samples were evaluated in SMA patients before nusinersen and 15 months after nusinersen treatment. In addition, their contribution to the pathogenesis were evaluated with control group comparisons. SMA patients had higher GFAP and IL-6 levels ($p < 0.05$) and lower GDNF levels ($p < 0.05$) compared to controls. In ROC curve analyses, the diagnostic determinacy of GFAP had 87.5% sensitivity and 100% specificity when cutoff set at ≥ 6.12 ng/ml. In logistic regression model created by combining different molecules (GFAP, GDNF, YKL-40), the area under the curve reached 1.0 ($p < 0.001$). IL-6 and YKL-40 levels decreased under treatment; on the contrary, GDNF levels increased ($p < 0.05$). Higher CSF GFAP levels were associated with better clinical outcome (OR= 0.624, $p < 0.05$). To sum up, these findings support the hypothesis of glial cells and neuroinflammation contribute to SMA pathogenesis. GFAP is a biomarker of SMA with both diagnostic and prognostic significance, and its higher levels are associated with better clinical outcome. New therapy strategies against glial pathways and anti-inflammatory agents may have additional positive impact on existing therapies.

Keywords: Biomarker, nusinersen, astrocyte, GFAP, neuroinflammation

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER.....	x
TABLOLAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. TANIM.....	4
2.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	4
2.4. GENETİK VE PATOFİZYOLOJİ.....	5
2.5. HASTALIĞIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	7
2.5.1. Spinal Musküler Atrofi Tip 0.....	9
2.5.2. Spinal Musküler Atrofi Tip 1.....	9
2.3.3. Spinal Musküler Atrofi Tip 2.....	9
2.3.4. Spinal Musküler Atrofi Tip 3.....	10
2.3.5. Spinal Musküler Atrofi Tip 4.....	10
2.4. TANI	10
2.5. TARAMA.....	12
2.6. HASTALIĞIN YÖNETİMİ	12
2.7. TEDAVİ STRATEJİLERİ	14
2.7.1. Nusinersen.....	15
2.7.2. Onasemnogene Abeparvovec.....	18
2.7.3. Risdiplam	18
2.8. HASTALIK AKTİVİTESİNİN TAKİBİ	19
2.9. BİYOBELİRTEÇLER.....	21
2.9.1. Elektrofizyolojik Biyobelirteç Çalışmaları.....	22

2.9.2. SMN Protein Düzeyi.....	22
2.9.3. Beyin Omurilik Sıvısı Proteomik Analizi.....	23
2.9.4. Nörodejenerasyon ve Nörorejenerasyon İlişkili Biyobelirteçler	23
2.9.5. Glial Biyobelirteçler ve Nöroinflamasyon.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI.....	27
3.2. ARAŞTIRMANIN EVRENİ, ÖRNEKLEMİ VE ARAŞTIRMA GRUBU	27
3.2.1. Hasta Grubu	28
3.2.2. Kontrol Grubu.....	28
3.3. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ VE VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	29
3.3.1. Hasta Grubu (SMA).....	29
3.3.2. Kontrol Grubu.....	30
3.3.3. ELISA Analizleri	30
3.4. VERİLERİN ANALİZİ.....	35
4. BULGULAR	37
4.1. HASTALARIN DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ.....	37
4.2. KONTROL GRUBUNUN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ	38
4.3. HASTA VE KONTROL GRUBU KARŞILAŞTIRMALI ANALİZLER.....	39
4.3.1. Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması	39
4.3.2. ROC Eğrisi Analizleri.....	41
4.4. HASTA GRUBU ANALİZLERİ.....	43
4.4.1. Tedavi Altında Motor Fonksiyonel Ölçek Skorlarının Değişimi	43
4.4.2. Biyobelirteç Düzeyleri ve Zamanla Değişimi.....	45
4.4.3. Korelasyon Analizleri	47
4.4.4. Klinik Anlamlı Yanıt Skoru.....	49
5. TARTIŞMA.....	52
5.1. TOPLAM BOS PROTEİN KONSANTRASYONU TAYİNİNİN KLİNİK ÖNEMİ	53

5.2. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK GLİAL FİBRİLLARY ACİDİC PROTEİN (GFAP)	54
5.3. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK GLİAL CELL-DERİVED NEUROTROPHİC FACTOR (GDNF).....	55
5.4. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK İNTERLÖKİN 6 (IL-6).....	57
5.5. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK CHİTİNASE-3-LİKE PROTEİN-1 (CHI3L1 veya YKL-40).....	57
5.6. NUSİNERSEN TEDAVİSİNE KLİNİK YANITININ ÖN GÖRÜLMESİ AMACIYLA KULLANILABİLECEK BİYOBELİRTEÇLER.....	58
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

SMA	Spinal Musküler Atrofi
SMN1	<i>Survival Motor Neuron-1</i>
SMN2	<i>Survival Motor Neuron-2</i>
ASO	Anti-sense Oligonükleotid
SMN	Survival Motor Neuron
HFMSE	Hammersmith Functional Motor Scale Expanded
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
SnRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
NGS	Next Generation Sequencing
BKAP	Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli
EMG	Elektromiyografi
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
MÜAP	Motor Ünite Aksiyon Potansiyeli
CK	Kreatin Kinaz
NIV	Non-invaziv Pozitif Basıncı Ventilasyon
CPAP	Sürekli Pozitif Hava Yolu Basıncı Ventilasyon
BiPAP	Bifazik Pozitif Hava Yolu Basıncı Ventilasyon
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
HDAC	Histon Deasetilaz
FDA	United States Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
LP	Lomber Ponksiyon
AAV9	Adeno-ilişkili Virüs 9
6DYT	6 Dakika Yürüme Testi
RULM	Revised Upper Limb Module

CHOP-INTEND	Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders
HINE-2	Hammersmith Infant Neurological Examination Section-2
MFMM	Motor Function Measure
MUNE	Motor Unit Number Estimation
SMN-P	SMN Proteini
NF	Nörofilaman
pNFH	Nörofilaman Fosforlanmış Ağır Zinciri
NFL	Nörofilaman Hafif Zinciri
pTau	Fosforile-Tau
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GDNF	Glial Cell-derived Neurotrophic Factor
CHI3L1 (YKL-40)	Chitinase-3 Like-protein1
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-alfa
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
ALSFRS-R	ALS Functional Motor Scale Revised
MRC-SS	Medical Research Council Sum Score
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
Th1	Yardımcı T Hücre 1
Th17	Yardımcı T Hücre 17
CHIT1	Chitotriosidase 1
SD	Standart Deviasyon
OR	Odds Ratio
%95 CI	%95 Güven Aralığı
¥	Mann Whitney U Testi
π	Bağımsız Örnekler T Testi
α	Bağımlı Örnekler T Testi
β	Paired Wilcoxon Testi
§	Ki-kare Testi

ns	İstatiksel Anlamlılık İzlenmemiştir
**	$p < 0,05$
***	$p < 0,001$

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. SMA Hastalığı Patofizyolojisi	6
Şekil 2.2. Önerilen Multidisipliner Yaklaşım Modeli	13
Şekil 3.1. Hasta Grubuna Uygulanan Standart Tedavi Protokolü ve Çalışma Kapsamında Hasta Örneklerinin Değerlendirildiği Zaman Noktaları.....	29
Şekil 4.1. SMA Hastalarının BOS Biyobelirteç Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırması.....	40
Şekil 4.2. BOS GFAP Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi	41
Şekil 4.3. BOS GDNF Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi	42
Şekil 4.4. GFAP & GDNF (A) ve GFAP & GDNF & YKL-40 (B) Lojistik Regresyon Modeliyle Hesaplanan Öngörülen Olasılık (predicted probability) Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi	43
Şekil 4.5. Motor Ölçek Skorlarının Değişimi.....	44
Şekil 4.6. Moleküllerin BOS Düzeyinin Tedaviyle Değişimi.....	46
Şekil 4.7. Regresyon Modelinin Gücü ve Dahil Edilen Parametrelerin Kovaryansı	50

TABLOLAR

Tablo 2.1.	SMA Alt Tipleri ve Özellikleri	8
Tablo 2.2.	SMA Hastalarında Motor Fonksiyonel Durumu Değerlendiren Ölçekler	20
Tablo 4.1.	Hastaların Demografik Verileri ve Klinik Özellikleri	37
Tablo 4.2.	Hastaların Tedavi Öncesi Motor Ölçek Sonuçları	38
Tablo 4.3.	Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Özellikleri.....	39
Tablo 4.4.	Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi.....	39
Tablo 4.5.	SMA Tanısını Öngörmeye Biyobelirteç Değerlerinin ROC Eğrisi Analizi	41
Tablo 4.6.	Motor Ölçek Skorlarının Sonuçları	44
Tablo 4.7.	Başlangıç BOS Biyobelirteç Düzeyleri ve Tedavi Altındaki Değişimleri	45
Tablo 4.8.	Klinik Verilerinin Biyomolekül Seviyeleri ile Korelasyonu	47
Tablo 4.9.	Tedavi Altında Değerlendirilen Motor Ölçek Puanlarının Biyomolekül Düzeylerindeki Değişim ile Korelasyonu	48
Tablo 4.10.	Zaman Noktaları Arasında Biyomoleküllerin Düzeyindeki Değişim ile Motor Ölçek Puanlarındaki Değişimin Korelasyonu	48
Tablo 4.11.	Klinik Anlamlı Yanıt Skorunu Öngörebilecek Model	50
Tablo 4.12.	Kötü Klinik Sonlanım ile İlişkili Bağımsız Risk Faktörleri.....	51

1. GİRİŞ

Spinal Musküler Atrofi (SMA), spinal kordun ön boynuz hücrelerini ve beyin sapı motor nükleuslarını tutan, ilerleyici motor nöron kaybı ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Hastalığın seyri sırasında istemli kaslarda, bulber kaslarda ve solunum kaslarında ilerleyici güçsüzlük gelişir. Hastaların %95'inde 5q11,2-13,3'de haritalanmış *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)* genindeki *ekzon 7* ve/veya *ekzon 8*'deki homozigot delesyonlar patogeneze sorumludur. Ancak hastalığın klinik seyrini ve alt tiplerini belirleyen en önemli faktörden biri, *SMN1* geninden birkaç nükleotit farkla ayrılan *Survival Motor Neuron 2 (SMN2)* geninin kopya sayısıdır.

2000'li yıllara kadar bilinen herhangi bir tedavisi olmayan SMA hastalığının tanısının konulması; hastalar ve aileleri üzerinde derin bir etki oluşturmaktaydı. Fakat 2010'ların başından itibaren SMA tedavisinde yeni moleküller ve gen tedavisi gündeme gelmedi ve hastalığın seyrinde dramatik değişiklikler gözlenmeye başladı. Günümüzde hastalığın tedavisinde kullanılmak için onay almış 3 tedavi bulunmaktadır. 5q ile ilişkili tüm SMA türleri için ülkemizde onaylanmış tek tedavi olan nusinersen bir antisense-oligonükleotid (ASO) türevidir ve ana farmakolojik etki mekanizması *SMN2* pre-mRNA'daki spesifik diziye bağlanmasıdır. Bu sayede *SMN2* pre-mRNA splicing sürecini değiştiren nusinersen, tam uzunlukta Survival Motor Neuron (SMN) proteini ekspresyonunu tetikler. Sonuç olarak, *SMN2* geninden fonksiyonel SMN protein sentezini artırır ve hastalık seyrinde klinik iyileşme sağlar. Erişkin SMA hastalarında tedavi yanıtını değerlendirmek amacıyla kullanılan ve kabul gören tek biyobelirteç Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE) motor skalası olup, bu skorlamadaki 3 puanlık artış klinik anlamlı yanıt olarak kabul edilmektedir. Ancak, mevcut motor ölçek hastalardaki minör değişiklikleri değerlendirmede yetersiz kalmakta ve bazı hasta gruplarındaki motor gelişimi yansıtamamaktadır.

SMA hastalarındaki fenotipik heterojenite; erken tanı, prognoz ve tedavi yanıtının izlenmesinde zorluklara neden olabilmektedir. Bu dinamik ortamda, hastalar için klinik karar vermeyi kolaylaştırmak ve tedavi yanıtını değerlendirmek için biyobelirteçlere olan ihtiyaç tedavi seçeneklerinin artması ile önem kazanmıştır. Son

yıllarda çalışmalar, SMA gibi nadir hastalıkların patogenezinde rol oynayan ortak mekanizmaları tanımlayarak tedavi hedefleri bulma veya mevcut hastalıklar için tanısal ve terapötik biyobelirteç geliştirme üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Ayrıca, SMA patogenezinin sadece motor nöron dejenerasyonu ile kısıtlı olmadığı, başta immün sistemle ilişkili birçok farklı hücre ve doku tipinin de sürece katkı sağladığı son yıllarda ortaya koyulmuştur. Glia hücrelerinin ve ikincil nöroinflamasyonun SMA sürecine katkısı güncel literatürde kendine yer edinmiş, biyobelirteç çalışmalarına ve hatta tedavi hedeflerine konu olmuştur.

Bu çalışmada, glial hücre ürünleri ve nöroinflamatuvar moleküllerin SMA patogenezindeki rolünü göstermek ve hastalığa özgü biyobelirteç olabilecek molekülleri saptamak amaçlanmıştır. Seçilen moleküllerin beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerindeki düzeyleri, nusinersen tedavisi öncesi ve tedavi süresince değerlendirilmiştir. Tedavi süresinde moleküllerin düzeyinde ortaya çıkan değişikliğin kliniğe yansımaları irdelenmiş, tedavi yanıtını değerlendirebilecek ve/veya öngörebilecek moleküller araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarının tanısal, prognostik ve terapötik biyobelirteçlerin tanımlanmasına ve kişiye özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

1891 yılında Viyana Üniversitesi'nde araştırmalarını yürüten Guido Werdnig, alt ekstremitelerde ilerleyici güçsüzlükle birlikte üst ekstremitelerde tremor izlenen ve infantil dönemde ölümlerle sonlanan iki vakayı yayınlamıştır [1]. Bu hastaların otopsi bulgularında, bilateral simetrik ön boynuz motor nöron kaybı izlendiğini rapor etmiştir [1]. Aynı yıl, Heidelberg Üniversitesi'nden Johann Hoffman ise benzer bulgularla izlenen ve erken çocukluk döneminde hayatını kaybeden hastaları derlemiştir ve ilk kez "Spinale Muskelatrophie" (Spinal Musküler Atrofi) tanımını kullanmıştır [2, 3]. Ek olarak, Dr. Hoffman etkilenmiş bebeklerin sağlıklı ebeveynlerden doğduğunu ancak kardeşlerinde aynı hastalığı taşıdığına altını çizmiştir [2]. Gözlemleri SMA hastalığının tanımlanmasını sağlayan bu iki bilim insanının anısına halen günümüzde SMA tip 1, Werdnig-Hoffman hastalığı olarak adlandırılmaktadır. SMA tanımının ilk kez kullanılmasından yaklaşık olarak yarım asır sonra; Wohlfart [4], Kugelberg ve Welander [5] benzer bulguları olan daha geç başlangıçlı ve hafif seyirli vakaları bildirmiştir. Günümüzde SMA tip 3 olarak tanımlanan bu gruba katkısı olan bilim adamlarının isimleri verilmiş olup; halen Wohlfart-Kugelberg-Welander hastalığı olarak anılmaktadır. 1964'te ise Dubowitz, bebeklik döneminde başlayan ve Werdnig ile Hoffmann tarafından tanımlanan infantil forma göre daha uzun sağ kalıma sahip 12 vakalık bir seri yayınlamıştır [6]. Bu veriler, bebeklik döneminde başlayıp görece daha yavaş ilerleyen bir fenotip olması nedeniyle "ara form" olarak adlandırılan SMA tip 2'nin ilk sistematik tanımı olarak kabul edilir [6]. SMA tip 2'nin günümüzde Dubowitz hastalığı olarak anılması bu nedenledir.

Werdnig ve Hoffman'ın hastalık tanımından yaklaşık yüzyıl sonra, 1995 yılında, Dr. Melki ve ekibi, *SMN1* genini tanımlamış ve SMA'lı bireylerde bu genin mutasyona uğradığını göstermiştir [7]. Aynı zamanda, Dr. Melki *SMN1*'in "yedek geni" olarak adlandırılan *SMN2* genini de aynı yıl tanımlamıştır [7]. *SMN1* ve *SMN2* genlerinin keşfi, bir taraftan SMA tanısını doğrulamak için günümüzde kullanılan genetik testlerin gelişmesine yol açarken; diğer taraftan da günümüzde kullanıma giren tedavi seçeneklerine yol gösterici olmuştur.

2.2. TANIM

Spinal Musküler Atrofi, spinal kordun ön boynuz hücrelerini ve beyin sapı motor nükleuslarını tutan, ilerleyici motor nöron kaybı ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır [8]. Hastalığın seyri süresince istemli kaslarda, bulber kaslarda ve solunum kaslarında progresif güç kaybı gelişir [8]. Otozomal resesif kalıtım gösteren bu hastalık *5q11.2-13.3*'te haritalanmış *SMN1* genindeki homozigot delesyonlar ile ilişkilendirilmiştir [7, 9]. Hastalık fenotipi hastalar arasında belirgin farklılıklar gösterir ve hastalığın klinik seyrini ve alt tiplerini belirleyen en önemli faktörlerden biri *SMN2* geni kopya sayısıdır [10].

Semptomların ortaya çıkış yaşına ve hastaların ulaşabildiği en ileri motor gelişim basamağına göre SMA hastaları gruplara ayrılmıştır [8]. Bu gruplandırma günümüzde halen prognostik açıdan yol gösterici olmaya devam etmektedir ve özellikle klinik deneylerde kohortları tanımlamak için kullanılmaktadır [11]. Fenotipik özelliklere göre yapılan sınıflandırmada hastalığın bilinen beş formu tanımlanmıştır (*Bknz: 2.5 Hastalığın Klinik Özellikleri*) [8]. *SMN2* kopya sayısı bu hastalarda hastalığın şiddetini belirleyen önemli bir faktördür; kopya sayısındaki artış daha hafif ve geç başlangıçlı fenotipler ile ilişkilendirilmiştir [10].

2.3. EPİDEMIYOLOJİ

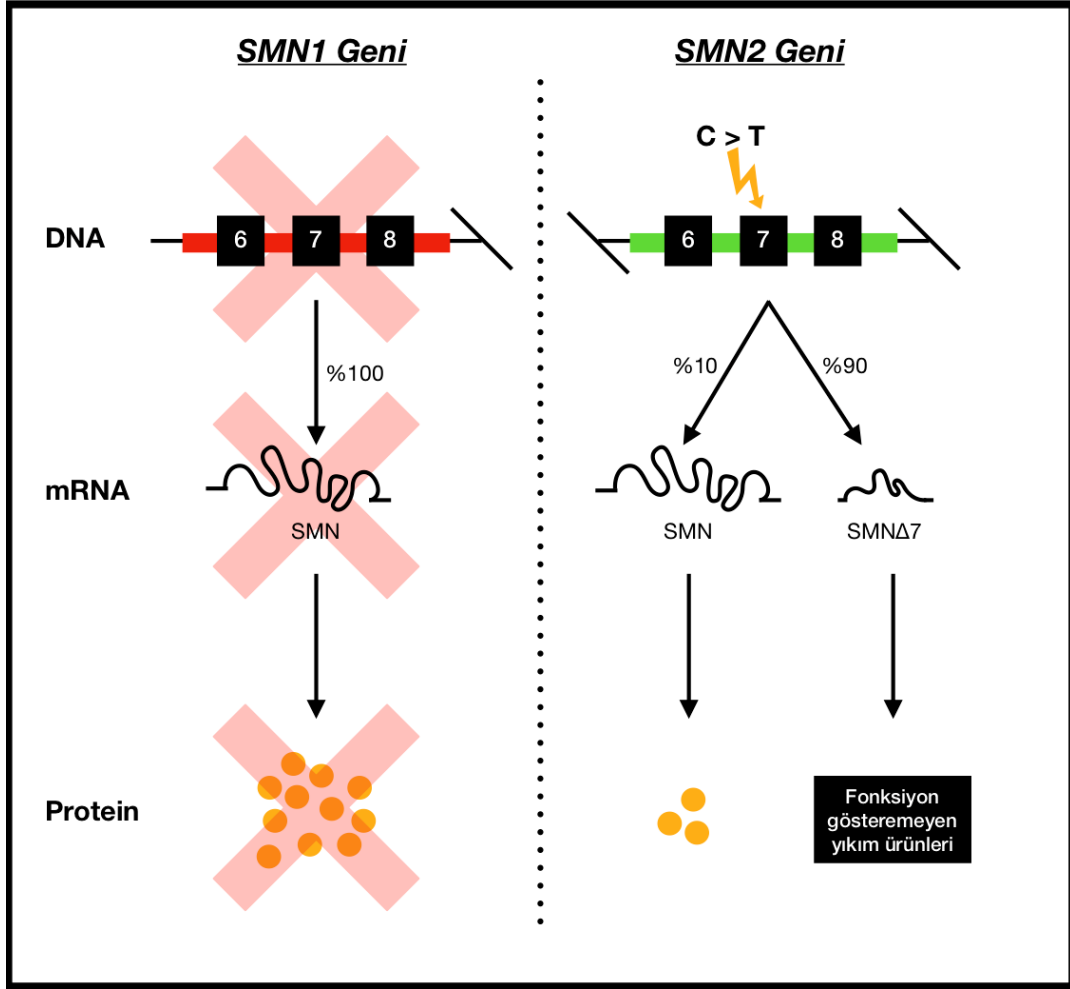
SMA'nın dünya çapındaki insidansı ~10.000 canlı doğumda ~1 [12-14] veya 100.000 canlı doğumda ~7.8-10'dur [15]. Amerika Birleşik Devletleri'nde laboratuvar verileri kullanılarak belirlenen tahmini pan-etnik insidans 11.000 canlı doğumda 1'dir [12]. Avrupa'da insidans 3.900–16.000 canlı doğumda ~1'dir (~100.000 canlı doğumda medyan 11.9) [16, 17]. 29 ülkeyi temsil eden küresel SMA kayıt veri tabanı verilerine göre hastalığın cinsiyet dağılımı yaklaşık olarak benzerdir [17]. SMA tip 1'in prevalansı, beklenen yaşam süresinin daha kısa olması nedeniyle diğer alt tiplere göre daha düşüktür. Ancak, hastalık modifiye edici ilaçların ortaya çıkması ile sağkalım artmıştır. Bu durum prevalans artışını da beraberinde getirmektedir. Tedavi seçenekleri ortaya çıkmadan önce, SMA'nın prevalansı genellikle 100.000 kişide 1-2 olarak bildirilmekteydi [18].

Gebelik öncesi taşıyıcı bireylerin tarama yöntemleri ile tanınması ve bu bireylerde yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması ile dünyanın birçok yerinde SMA insidansının zaman içerisinde azalması beklenmektedir. Diğer taraftan, yeni hastalık modifiye edici ilaçların bulunması ve bakım standartlarındaki artışla birlikte küresel hastalık prevalansının artması muhtemeldir.

2.4. GENETİK VE PATOFİZYOLOJİ

Hastalık fenotipindeki değişkenliği ve mevcut tedavilerin etki mekanizmalarını anlamak için SMA genetiğine ve patofizyolojisine aşina olmak gerekir. Genetik etioloji keşfedilmeden önce SMA hastaları arasındaki farklı fenotipik seyir hastalık patofizyolojisini anlamayı zorlaştırıyordu [19]. Tek bir gen kusurunun nasıl bu kadar geniş bir spektrumda bulgu verdiği klinisyenler arasında tartışma konusuydu. Bu bilmecenin çözümü, 1995 yılında Dr. Melki'nin fenotipten bağımsız olarak SMA vakalarının %95'inin, *SMN1* genindeki homozigot delesyondan kaynaklandığını keşfetmesiyle başladı [20].

İnsanlarda, her alelde *SMN* geninin 2 formu bulunur: telomerik form (*SMN1*) ve sentromerik form (*SMN2*) [20]. *SMN1* geninin transkripsiyonu, SMN proteinini kodlayan tam uzunlukta mRNA transkriptleri üretir. *SMN2* geninin; *SMN1* geninden ayrışmasına yol açan ise ekzon 7 üzerindeki tek nükleotid değişimidir [21]. Bu tek nükleotid değişikliği ekzon 7 splicing bölgesinde bulunan sitozinin timine (C>T, transisyon) dönüşümüdür. Ekzon 7'deki bu translasyonel olarak sessiz tek nükleotid değişikliği, *SMN2* geninden üretilen mRNA transkriptlerinin %90'unda ekzon 7'nin atlanmasına yol açar [21, 22]. *SMNΔ7* olarak adlandırılan ve ekzon 7 eksik olan bu transkriptten elde edilen protein kararsızdır ve hızla bozular. Diğer taraftan insanlarda değişken kopya sayılarında bulunabilen *SMN2* geninin transkriptlerinin %10'u kararlı ve tam uzunlukta SMN proteini kodlar [23]. Dolayısıyla, *SMN2* mRNA transkriptlerinin yalnızca küçük bir kısmı ekzon 7'yi içerir ve normal protein üretebilir (**Şekil 2.1**). Bu nedenle normalde alt motor nöronları korumak için gerekli olan SMN proteini düzeyi, *SMN1* geninin en az bir kopyasına sahip bireylerde elde edilebilir [24].



Şekil 2.1. SMA Hastalığı Patofizyolojisi

SMA hastalığı çoğunlukla (%95) *SMN1* geni üzerindeki ekzon 7 ve 8'de veya yalnızca ekzon 7'deki homozigot delesyonlardan kaynaklanır [23]. Yaklaşık %5 hastada bir alelde *SMN1* geninde delesyon izlenirken diğer alelde bir nokta mutasyonu olacak şekilde bileşik heterozigot mutasyon mevcuttur [23].

SMA hastalarında her iki *SMN1* kopyası da mutanttır. Böylece, motor nöronun hayatta kalması, yalnızca bireyin *SMN2* kopyaları tarafından üretilen yetersiz miktardaki SMN proteinine bağlı hale gelir. Daha fazla *SMN2* kopyasına sahip bireyler, daha fazla SMN proteini üretir ve bu nedenle daha hafif bir fenotipe sahiptir [10, 25, 26]. Bu anlayışla, *SMN1* geninin değiştirilmesi ve *SMN2* geninden protein üretiminin artırılması, SMA tedavisinde önemli hedefler olarak görülmüştür.

Yeterli düzeyde SMN proteininin olmaması, alt motor nöronların kaybına ve buna bağlı olarak ilerleyici güçsüzlüğe ve iskelet kaslarında atrofiye yol açar [11].

Ancak halen günümüzde SMN proteininin motor nöronlardaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. Moleküler düzeyde, SMN proteini tüm hücrelerde eksprese edilmekte, fakat azalan SMN protein seviyelerinden daha çok motor nöronlar etkilenmektedir [27]. SMN proteininin birincil rolünün, pre-mRNA splicing süreci için gerekli olan küçük nükleer ribonükleoprotein (SnRNP) komplekslerini bir araya getirmek olduğu düşünülmektedir [28]. *SMN2* geni olmayan hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar *SMN* geninin susturulmasının; embriyonik dönemde veya yaşamın çok erken dönemlerinde ölümcül olduğunu göstermiştir [29-31]. İnsanlarda da total SMN protein eksikliğinin embriyonik olarak öldürücü olduğu hem *SMN1* hem de *SMN2* genlerinden yoksun hasta vakalarının bildirilmemiş olmasıyla desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada insan *SMN2* transgeninin, homozigot mutant *SMN* (-/-) fareye aktarılması sonucunda embriyonik ölüm önlemiştir [32]. Hatta insanlardaki SMA hastalığına benzer şekilde, *SMN2* kopya sayısındaki artış sayesinde daha hafif fenotiplere sahip hayvan modelleri geliştirilmiştir [32]. Çalışmalar, SMN proteininin hem motor ünitenin embriyonik gelişiminde hem de doğum sonrası ve yaşam boyunca motor nöronların korunmasında rol oynadığı düşündürmektedir [33].

2.5. HASTALIĞIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

SMA hastalığında hâkim klinik özellikler kas güçsüzlüğü ve kas atrofisidir. Güçsüzlük genellikle simetrik olup proksimal kaslar distal gruplara göre daha fazla etkilenir [34]. Son 125 yılda, hastalığın klinik belirtilerini ve geniş klinik şiddet aralığını inceleyen raporların tümü hastalıktaki temel patolojiyi ön boynuz motor nöron dejenerasyonu olarak kabul etmiş ve vurgulamıştır [19, 35]. Hastalık seyri sırasında aksiyal, interkostal ve bulber kasların da etkilemesi beklenir [35]. Genel olarak, hastalık süreci boyunca, daha erken başlangıçlı hastalarda güçsüzlük daha hızlı ilerlerken, erişkin başlangıçlı hastalarda zayıflık nispeten stabil seyredebilmektedir [36]. Klinik şüphe infantlarda hipotoni, üst ekstremitelerde hâkim proksimal güç kaybı ve hiporefleksi veya arefleksi ile kendini gösterir. Yüz kaslarının korunmasına rağmen belirgin bulber güçsüzlük bir diğer önemli bulgudur. Ayrıca interkostal kaslarda zayıflık ve diyaframın göreceli olarak korunması vardır, bu da tipik "çan şeklinde" göğüs ve paradoksal solunum paterni ile sonuçlanır [24]. Çocukluk çağı başlangıçlı SMA hastalar da benzer şekilde hipotoni ve proksimal hâkim güçsüzlük ile karakterize

edilir, ancak daha bulber ve solunum bulguları daha az belirgindir. Geç başlangıçlı hastalarda proksimal hâkim güç kaybına eşlik eden alt motor nöron bulguları klinik şüphenin temelini oluşturur [37].

Tanımlanan çoklu fenotipler 1991 yılında Spinal Musküler Atrofi Uluslararası Konsorsiyumu'nda bir sınıflandırma altında birleştirilmiştir [38]. Bu sınıflandırma, hastanın sahip olabileceği en yüksek motor gelişim basamağına (oturma veya ayakta durma) ve başlangıç yaşına göre temel olarak üç SMA tipi olduğunu vurgulamıştır [38]. Yıllar içerisinde yapılan modifikasyonlar ile SMA tip 3 kategorisi başlangıç yaşına göre yeniden düzenlenmiş, erişkin başlangıçlı vakalar için tip 4 kategorisi eklemiştir [36]. Ayrıca, 1991 sınıflamasına sonradan, doğum öncesi başlangıçlı ve haftalar içinde ölen hastalar için tip 0 grubu dahil edilmiştir [36]. Sınıflama (**Tablo 2.1**) günümüzde halen geçerliliğini korumakla beraber, tek bir SMA tipi içerisindeki bireylerde dahi hastalık şiddetinin farklılık gösterdiği bilinmektedir. Günümüzde sınıflama sıklıkla klinisyenlerin hastalara ve ailelerine prognostik bilgi sağlamasına yardımcı olur ve hastaların ileride gelişebilecek ihtiyaçlarını tahmin etmeye olanak sağlar. Ayrıca, klinik çalışmalarda hastaların sınıflandırılmasında da önemini korumaktadır.

Tablo 2.1. SMA Alt Tipleri ve Özellikleri

Sınıflandırma	Başlangıç Yaşı	SMN2 Kopya Sayısı	Klinik
Tip 0	Prenatal	0	Hipotoni, arefleksi, fasyal dipleji, kardiyak anomaliler
Tip 1 <i>Werdnig-Hoffmann Hastalığı</i>	<6 ay	1-2	Flask paralizi hakimdir ve desteksiz oturamaz
Tip 2 <i>Dubowitz Hastalığı</i>	7-18 ay	3	Desteksiz oturabilir ama yürüyemez
Tip 3 <i>Wohlfart-Kugelberg-Welander Hastalığı</i>	Tip 3a	<3 yaş	Yürüyebilir (<i>erişkinlikte kaybedebilir</i>)
	Tip 3b	3-21 yaş	Yürüyebilir (<i>erişkinlikte sürdürebilir</i>)
Tip 4	>21 yaş	4-8	Proksimal güçsüzlük hakimdir ve yavaş seyirlidir

2.5.1. Spinal Musküler Atrofi Tip 0

SMA tip 0, fetal hareketlerde azalma öyküsü olan şiddetli halsizlik ve hipotoni ile başvuran yenidoğanları tanımlamak için kullanılır. Bu durumda, zayıflık muhtemelen doğum öncesi başlangıçlıdır. Muayenede, tip 0 olan bebeklerde arefleksi, fasiyal dipleji, atriyal septal defektler ve eklem kontraktürleri olabilir [39]. Solunum yetmezliği erken dönemlerde ortaya çıkar ve hastalar sıklıkla yaşamın ilk 6 ayında kaybedilir [40].

2.5.2. Spinal Musküler Atrofi Tip 1

Werdnig-Hoffman hastalığı olarak da bilinen tip 1 SMA'lı bebekler, 6 aydan önce hipotoni, zayıf baş kontrolü ve azalmış tendon refleksleri ile kendini gösterir. Hastalar, yardımsız oturma becerisine asla ulaşamazlar [1-3, 41]. Derin hipotoni, uzanırken “kurbağa bacağı” duruşu ve baş kontrolünün olmaması sık rastlanan bulgulardır. İnterkostal kaslardaki zayıflık ve diyaframın göreceli olarak korunması, çan şeklinde bir göğüs ve bazen “göbek solunumu” olarak adlandırılan paradoksal bir solunum modeli oluşturur [42, 43]. Tip 1 SMA'lı bebeklerde dil ve yutkunma güçlüğü gelişir ve sıklıkla dilde fasikülasyonlar izlenir. Fasiyal güçsüzlük beklenir, ancak bu genellikle erken dönemde ortaya çıkmaz. Dil kasları ve faringeal kasların zayıflaması ile aspirasyon riski gelişir ve 2 yaşından önce solunum yetmezliği ortaya çıkar. Bu bebeklerde ağır kas güçsüzlüğüne rağmen biliş normaldir; tanı anında genellikle uyanık ve dikkatlidirler [41-43].

2.3.3. Spinal Musküler Atrofi Tip 2

Tip 2 SMA'lı çocuklar gelişimlerinin bir noktasında yardımsız oturabilirler; ancak asla bağımsız olarak yürüyemezler [6]. SMA'nın bu ara formu, kollardaki güçsüzlükten ziyade ilerleyici proksimal alt ekstremitte güçsüzlüğü ile kendini gösterir. Muayenede hipotoni ve arefleksi izlenir [42]. Komorbiditelerin çoğunu, kaslardaki zayıflığa bağlı olarak ortaya çıkan kemik ve eklem gelişim komplikasyonları oluşturur. Progresif skolyoz, eklem kontraktürleri ve mandibula ankilozu beklenen komplikasyonlardır. Skolyoza eşlik eden interkostal kaslardaki güçsüzlük restriktif akciğer hastalığına zemin hazırlar [36]. Bu çocuklarda da bilişsel kapasite normaldir [44].

2.3.4. Spinal Musküler Atrofi Tip 3

Wohlfart-Kugelberg-Welander hastalığı olarak da adlandırılan tip 3 SMA'lı çocuklar ve yetişkinler, yaşamları boyunca bir noktada yardımsız yürüyebilirler [4, 5]. Kollardan çok bacaklarda ilerleyici proksimal güçsüzlük hakimdir [19]. Bacaklardaki güçsüzlük bir noktada tekerlekli sandalye ihtiyacını gerektirebilir. Tip 2 SMA'lı bireylerden farklı olarak, skolyoz ve buna bağlı komorbiditeler daha nadirdir. Solunum kaslarında güçsüzlük de çok azdır veya hiç yoktur. Kognisyon ve yaşam beklentisi sağlıklı bireylerle benzerdir [45, 46]. SMA tip 3, günümüzde tip 3a (semptomların 3 yaşından önce başlayanlar) ve tip 3b (semptomları 3 yaşından sonra başlayanlar) olarak iki alt gruba ayrılmıştır [11]. Tip 3b grubuna dahil olan hastaların, 20 yaşından sonra bağımsız olarak yürümeye devam etme olasılığı daha yüksektir [42].

2.3.5. Spinal Musküler Atrofi Tip 4

En nadir görülen ve en hafif SMA formudur. Bu grup hastalar, SMA vakalarının %5'ten azını temsil eder. Bu bireyler yürüyebilirler ve tip 3'e benzer şekilde proksimal güç kaybından şikayetçidir [8]. Başlangıç yetişkinlik dönemindedir ve genellikle 30 yaşında veya daha büyüklerde ortaya çıktığı kabul edilir, ancak daha genç başlangıçlı olabilir [42, 47].

2.4. TANI

Hipotoni ve motor gelişim basamaklarında gecikme olan infantlarda ayırıcı tanıda SMA mutlaka düşünülmelidir [37]. SMA hastalığının tanısında günümüzde kabul edilen altın standart genetik tanı olup hastalığı düşündüren klinik bulguların varlığında ilk basamak tanı yöntemi olmalıdır [48]. Genetik tanı imkanlarının yaygınlaşması ile diğer tanı yöntemlerinin kullanımı sınırlanmıştır.

SMA hastalarında en sık gözlenen mutasyon, *SMN1* geninde ekzon 7'nin izole veya ekzon 8 ile homozigot delesyonudur. Bu mutasyon "polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)" veya alele spesifik "polymerase chain reaction (PCR)" yöntemi ile %95 duyarlılık ve %100 özgüllükle saptanmaktadır. Hastaların yaklaşık %96'sı bu şekilde tanı alabilmektedir [49, 50]. Ancak klinik şüphe devam eden hastalarda bu yöntem ile tanı doğrulamadığında; *SMN1* geni kopya sayısının multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

yöntemi ile tayin edilmesi gerekmektedir. %3-4 vakada *SMN1*'deki diğer mutasyonların hastalığa neden olduğu bilinmektedir (*Bknz: 2.4 Genetik ve Patofizyoloji*). Bu hastalarda tipik olarak diğer aleldeki *SMN1* delesyonuna bağlı olarak tek kopya *SMN1* geni izlenebilir. Tek kopya *SMN1* geni olan hastalarda mevcut kopyada olabilecek nokta mutasyonu, insersiyon veya delesyon varlığının araştırılması gerekir. Bu vakalarda *SMN1* geninin ekzonlarından yeni nesil dizileme ("next generation sequencing", NGS) ile sekanslama önerilmektedir [24, 49].

SMN1 geninde homozigot mutasyon saptanan hastaların bir sonraki aşamada *SMN2* kopya sayısının MLPA ile analiz edilmesi, SMA tipini ve prognozu belirlemek amacıyla birçok merkezde uygulanan bir yöntemdir [24, 51]. *SMN2* kopya sayıları, genel popülasyonda kromozom başına 0 ile 4 arasında değişebilir [11].

SMA tip 1 ve tip 2 hastalarında genellikle elektrofizyolojik değerlendirme gerekmez. Elektrofizyolojik değerlendirme fenotipin daha az şüphe çektiği kronik formlarda bulguları desteklemeye ve atipik vakalarda hastalığın nörojenik doğasını aydınlatmaya yardımcı olur. Sinir iletim çalışmalarında, duyuşal tutulum genellikle beklenmez. Ancak, bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdlerinde azalma ve motor ileti hızında hafif düzeyde yavaşlama izlenebilir. Ardı sıra uyarım incelemelerde düşük frekanslarda dekrement gözlenebilir. Benzer şekilde, tek lif elektromiyografi (EMG) çalışmalarında artmış jitter saptanabilir. Ardı sıra uyarım çalışmalarında gözlenen bu özellikler, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi daha hızlı denervasyon ve re-inervasyon potansiyeline sahip motor nöron hastalıklarında daha nadirdir. İğne EMG'de alt motor nöron tutuluşuna işaret eden bulgular kaydedilir. İstemli kası sırasında, motor ünite aksiyon potansiyelinde (MÜAP) azalmaya bağlı olarak zayıf katılım, kompanzasyona bağlı olarak büyük MÜAP'lar ve anormal spontan aktivite göstergesi olan fibrilasyon potansiyelleri tipiktir. Fibrilasyon potansiyellerinin yanı sıra pozitif keskin dalgalar kaydedilebilir ve anormal spontan aktivitenin sayısı, hastalığının ağırlığı ile ilişkilidir. Erişkin dönemde çok daha düşük amplitütlü ve kısa süreli olabilirler. Elektrofizyolojik bulgular hastalığın süresi ilerledikçe ağırlaşır; katılımda azalma belirginleşir ve büyük MÜAP'lar yaygınlaşır.

Serum kreatin kinaz (CK) seviyeleri genellikle normal veya hafif yüksektir. Ancak belirgin şekilde (10x) yüksek CK seviyeleri olan birkaç olgu literatürde

mevcuttur. Bu nedenle bu test tanıyı dışlamaz [52]. Tipik olgularda kas biyopsisine gerek yoktur.

2.5. TARAMA

Spinal Musküler Atrofi, yaklaşık 1/50 (% 0,98-2,02, etnik kökene bağlı olarak) taşıyıcı frekansı ile en yaygın genetik bozukluklardan biridir [12]. *SMNI*'deki nispeten yüksek taşıyıcı delesyon sıklığı göz önüne alındığında, ailede SMA öyküsü olmasa bile, ırk veya etnik kökene bakılmaksızın tüm çiftlere taşıyıcı testi yapılmasını önerilmektedir [53]. Ülkemizde de Ocak 2022'den beri taşıyıcı taraması evlilik planı olan çiftlere yapılmaktadır. Ayrıca, hastalığı modifiye eden tedavilerin ortaya çıkması ile SMA Türkiye'nin de içinde olduğu birçok ülkede yenidoğan tarama programına alınmıştır.

2.6. HASTALIĞIN YÖNETİMİ

SMA'lı hastaların bakımı disiplinler arası yönetim gerektirir. Hastaların genetik, respiratuvar, gastroenterolojik, ortopedik ve psikososyal açıdan ele alınması gerekir. SMA'da bakım standartları konusunda genel tedavi önerileri ilk kez 2007 yılında yayınlanmıştır [54]. Ancak, bakım standartlarının uygulanması oldukça değişkendir ve toplumların kültürel bakış açısı, sosyoekonomik faktörler ve bölgesel kaynakların mevcudiyeti gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Hastalığın tedavi sürecinde ortaya çıkan yeniliklerle birlikte SMA tanısı ve hasta bakımına ilişkin tavsiyelerin güncellenmiş versiyonu 2018 yılında yayınlanmıştır [24, 55]. Koordinasyonu sağlayan bir doktorun kontrolünde farklı uzmanların değerlendirmeleri ile multidisipliner bir yaklaşıma duyulan ihtiyaç son kılavuzda vurgulanmıştır (**Şekil 2.2**) [55].

Fizyoterapi, zayıflamış kas fonksiyonunu optimize etmeyi veya korumayı ve eklem kontraktürleri veya skolyoz gibi ciddi deformiteleri önlemeyi amaçlar [24]. Progresif skolyozun ortopedik tedavisi erken cerrahi müdahale gerektirebilir [24]. Respiratuvar bakım için öneriler, solunum fonksiyon testleriyle hastaların düzenli olarak değerlendirilmesine ve uykuda solunum aktivitesinin takibine vurgu yapar [55]. Hipoksi ve hiperkarbi açısından klinisyenin dikkatli olması önerilir. Gerekli durumlarda önce non-invaziv sonrasında invaziv mekanik ventilasyon planlanmalıdır [55]. Non-invaziv

pozitif basınçlı ventilasyon (NIV), solunum yetmezliğine “hazırlanmak”, göğüs duvarı distorsiyonunu önlemek ve nefes darlığını hafifletmek için tüm semptomatik bebeklerde ve desteksiz oturma basamağına erişememiş hastalarda önerilmektedir [56]. SMA’lı hastalar için önerilen destekleyici non-invaziv yöntem bifazik pozitif hava yolu basınçlı (BiPAP) ventilasyondur [57]. Sürekli pozitif hava yolu basınçlı (CPAP) ventilasyonun SMA hastalarını yorabileceği ve tam zamanlı kullanım durumunda makinadan ayrılmayı zorlaştıracağı bilinmelidir [57]. CPAP, kronik solunum yetmezliğini tedavi etmek için bu hastalarda kullanılmamalıdır, ancak ventilatörle senkronize olamayan hastalarda kontrollü kullanımı önerilir [55]. En iyi yaklaşım, her hastanın ihtiyacına ve yaşam kalitesine göre NIV kullanımının kişiselleştirilmesidir. Bu amaçla, uykuda solunum bozukluğu veya solunum yetmezliği şüphesi olan hastalarda BiPAP gerekliliği açısından uyku çalışması planlanmalıdır [55]. Ambulatuvar veya destekli oturma kabiliyeti olan SMA’lı hastalarda proaktif respiratuvar müdahale endike değildir ve klinik değerlendirme sonucuna göre destekleyici bakım sağlanması önerilir [58]. İnvaziv ventilasyon, NIV’nin yetersiz veya başarısız olduğu seçilmiş hastalarda veya ventilasyon sağlamak için etkili bir cihaz sağlanamayacak durumlarda tercih edilmelidir [55]. Trakeostomi kararı; hastanın klinik durumu, hastalığın prognozu ve bireyin yaşam kalitesi göz önünde bulundurularak alınmalıdır [55].



Şekil 2.2. Önerilen Multidisipliner Yaklaşım Modeli

Özellikle tip 1 ve tip 2 hastalarında, yutma ve konuşma terapistleri ile beslenme uzmanlarını içeren düzenli büyüme değerlendirmesi gereklidir [24]. Gastroözofageal reflü ve kabızlık gibi gastrointestinal semptomlar SMA'lı hastalarda yaygındır ve yakın takip gerektirir. Oral alımın yetersiz olduğu durumlarda endoskopik gastrostomi ile besin alımı sağlanmalıdır [24]. Yutma testinde başarısız olan ve gelişime geriliği izlenen tip 1 ve 2 tanılı hastalarda uzun süreli gastrostomi tüpü yerleştirilene kadar nazogastrik veya nazojejunal tüp ile beslenmenin sağlanması önerilir [24]. Desteksiz oturabilen hastaların yaklaşık %37'sinde beslenme yetersizliği bildirilmiş olup; bu hastalarda beslenme tüplerinin takviye nutrisyonel destek sağlamak amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir [59]. Ambulatuvar hastalarda yutma güçlüğü ve beslenme güçlüğü nadiren ortaya çıkmaktadır ve bu durumda kişiye özgü yaklaşım önerilmektedir [59].

SMA'nın akut bakımına yönelik öneriler arasında, hastane ortamında kullanılacak protokollerle akut olayların yönetimi ve yerel acil durum servisleriyle ön toplantılar yer alır. Tıbbi tesislere güvenli ulaşımın planlanması da dahil olmak üzere evde hastalık yönetim planlarının yapılandırılması üzerinde durulur [24, 55].

2.7. TEDAVİ STRATEJİLERİ

Monogenetik nöromusküler bir hastalık olmasına rağmen geniş fenotipik spektrumda karşımıza çıkan ve son on yıla kadar bilinen tedavisi olmayan SMA hastalığı, günümüzde ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA) hedefli tedavilerle semptomları düzeltilebilir hatta tedavi edilebilir bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

2010'ların başından itibaren SMA tedavisinde yeni moleküller ve gen tedavisi gündeme gelmiştir. Birçok molekül prelinik modellerde gösterilen etki mekanizmaları nedeniyle klinik çalışmalara dahil edilmiştir. İlk olarak histon deasetilaz (HDAC) enzim inhibasyonu sağlayan valproik asit [60-62] ve fenilbütirat [63] gibi moleküllerin, hiperasetilasyon yoluyla SMN protein ekspresyonunu artırabileceği düşünülmüş fakat randomize kontrollü çalışmalarda etkinliği gösterilememiştir. Kas gücü ve kas kitlesinde artış sağladığı düşünülen albuterol [64] ve büyüme hormonu [65] gibi anabolik ajanlar SMA hastalarında denenmiş, ancak beklenen etkinlik gösterilememiştir. Benzer şekilde, nöronal eksitoksiteyi azaltan

gabapentin [66], riluzol [67] ve olesoxime [68] gibi nöroprotektif ajanların da etkinliği klinik araştırmalarla test edilmiştir. Birincil sonlanım noktalarındaki olumsuz sonuçlara rağmen, bu araştırmalar gelecek çalışmaların sonlanım ölçütlerinin ve hasta alım kriterlerinin belirlenmesi açısından önemli bilgiler sağlamıştır.

Spinal musküler atrofi tedavisinde en önemli gelişme RNA ve DNA'yı hedefleyen tedavilerin klinikte kullanılmaya başlanmasıdır. *SMN2* geni splicing sürecini değiştiren nusinersen [69] ve risdiplam [70] tedavilerinin yanı sıra *SMN1* genini yerine koymayı hedefleyen onasemnogene abeparvovec [71] olmak üzere 3 tedavi günümüzde United States Food and Drug Administration (FDA) ve European Medicines Agency (EMA) tarafından SMA tedavisinde onaylanmıştır. Bu tedaviler hastalığın erken dönemlerinde (mümkünse presemptomatik dönemde) uygulandığında; bireylerin 'yürüme' gibi hastalığın doğal seyrinde mümkün olmayan motor gelişim basamaklarına ulaşabildiği gösterilmiştir [69-71]. Ülkemizde onaylı tek tedavi seçeneği ise intratekal uygulanan nusinersendir (*Spinraza*®).

2.7.1. Nusinersen

Nusinersen, erken ve geç infantil başlangıçlı SMA hastalarında randomize sham kontrollü klinik çalışmaları [69, 72] başarıyla tamamlayan ve 2016'da FDA tarafından onaylanan, ardından da dünya çapında birçok ülkede kullanılmaya başlayan ilk ilaçtır [69, 72, 73]. Nusinersen bir antisense-oligonükleotid (ASO) türevidir. Antisense-oligonükleotidler, RNA zincirlerindeki nükleotid dizilerine bağlanıp çeşitli etki mekanizmaları ile protein sentezini değiştiren moleküllerdir. Nusinersenin ana farmakolojik etki mekanizması; nükleazlara dirençli olması ve *SMN2* pre-mRNA'daki spesifik alana (intron 7'deki splicing susturucu alan) bağlanması sonucu meydana gelir [69, 72, 73]. Bu sayede *SMN2* pre-mRNA splicing sürecinde ekzon 7'nin atlanmasını önler ve tam uzunlukta SMN proteini ekspresyonunu sağlar [74]. Sonuç olarak *SMN2* geninden, *SMN1* geninden üretilen protein gibi fonksiyonel ve uzun ömürlü protein sentezlenmesini sağlar [69, 72, 73]. Günümüzdeki sonuçlarla ilacın bilinen ciddi yan etkisi olmamakla birlikte, nefrotoksisite, kan pıhtılaşma bozuklukları ve trombositopeni gibi diğer ASO'larda olduğu gibi tedaviye sekonder gelişen yan etkiler nadiren bildirilmiştir [75].

İlacın etkinliğini gösteren ilk çalışma olan çift kör, sham kontrollü, faz 3 ENDEAR çalışmasına SMA tip 1 tanılı 7 aydan küçük bebekler dahil edilmiştir [69]. Bu çalışmada nusinersen, dört yükleme dozunu (ilk üçü 14 gün, sonuncu 30 gün ara ile olacak şekilde) takiben dört ay aralıklarla idame tedavi olarak uygulanmıştır. Tedavi edilen bebeklerin >%50'sinde baş kontrolü ve bağımsız oturma gibi yeni motor gelişim basamaklarına ulaşılmıştır. Tedavi grubundaki hastaların %39'u kaybedilmiş veya mekanik ventilatöre ihtiyaç duymuşken, kontrol grubunda bu oran %68'dir ($p<0.05$) [69]. Takiben yayınlanan CHERISH çalışmasında ise nusinersen 0, 29, 85 ve 274'üncü günler olmak üzere 4 doz yükleme dozu şeklinde uygulanmış, ENDEAR çalışmasına benzer şekilde yükleme dozu sonrası idame tedaviye 4 ay aralıklarla devam edilmiştir [72]. CHERISH çalışması verileri incelendiğinde nusinersen ile tedavi edilen çocukların %57'sinde motor ölçeklerde daha iyi yanıtlar elde edilirken, sham uygulanan çocukların ancak %26'sında bu skorlarda iyileşme gözlemlenmiştir [72]. ENDEAR ve CHERISH çalışmalarından gelen veriler ışığında nusinersen tüm SMA hastalarının tedavisi için 2016'da önce FDA takiben de EMA tarafından onaylanmıştır. Ayrıca, uzatma çalışması (SHINE) sonuçları, ilacın uzun vadeli etkinliği ve güvenlik profilini doğrular niteliktedir [76]. Gerçek yaşam verileri ve erken erişim programlarından elde edilen veriler, nusinersenin en şiddetli neonatal başlangıçlı form olan genç bebeklerden [77-79], daha hafif fenotipleri olan çocuklara [80, 81] ve hatta yetişkinlere kadar çok geniş ve çeşitli hasta popülasyonlarında güvenliliğini ve etkililiğini göstermiştir [82-87]. 2022'nin başlarında, 12.000'den fazla SMA hastası nusinersen ile tedavi edilmiştir [18, 76]. İlk çalışmalar bebeklere ve çocuklara odaklanırken, yetişkin hastalarda nusinersen kullanımının güvenliliğini ve etkililiğini gösteren artan sayıda çalışma ve gerçek yaşam verisi peş peşe gelmiştir [82-87]. Grubumuz tarafından yayınlanmış 32 erişkin SMA hastasının tedavi yanıtlarını değerlendiren çalışmada da hastaların %78'inde motor fonksiyonel değerlendirme ölçeklerinde klinik olarak anlamlı artış gözlenmiştir [87]. Çalışmada, tedaviye yanıt veren SMA tip 3 hastalarının motor fonksiyonlarındaki düzelmenin 19. aya kadar devam ettiği görülmüştür [87]. SMA tip 2 ve 3 hastalarında nusinersen kullanımına dair bildirilen makalelerin 2021'de yayınlanan gözden geçirmesinde, etkinliği değerlendirmek için kullanılan fonksiyonel ölçümlerin en az birinde her yaştan SMA hastasında pozitif değişiklikler gösterilmiştir [88]. Bu sonuçlar, tedavi edilmemiş

kohortları içeren ve günümüzde artık tarihsel bir öneme sahip araştırmalara göre belirgin farklılık göstermektedir [89-91].

Nusinersen, ülkemizde 05.07.2017 tarihinde 6 aydan küçük SMA tip 1 hastaları için, 01.02.2019 tarihinde ise erişkin hastalar dahil tüm 5q SMA hastaları için Sağlık Bakanlığı onayı almıştır. Erişkin yaş gurubunda ilacın ülkemizde kullanımı resmî gazete de 01.02.2019 tarihinde yapılan ilk tebliğ ile SMA tip 2 ve 3 hastalarında CHERISH çalışma protokolü [72] uyarınca 0, 29, 85 ve 274'üncü günlerde olmak üzere 4 doz yükleme dozu şeklinde uygulanmak üzere onaylanmıştır. İdame tedaviler ilk dozu tedavinin 15. ayında olmak üzere 4 ay aralıklarla olacak şekilde planlanmıştır. İlk 4 yükleme dozu için tek sağlık kurulu raporu, idame tedavilerde ise her bir uygulama için ayrı ayrı sağlık kurulu raporuna istinaden "Sağlık Bakanlığı – Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu İlaçların Kişisel Tedavide Kullanılmalarını Değerlendirme Komisyonu" tarafından verilecek "İlaç Kullanım Onayı" gerekmektedir. İlgili ilaç, Sağlık Bakanlığı onayı ile temin edilebilmekte olup başvuru sırasında; SMA tanısını kanıtlayıcı genetik analiz, vertebra grafisi ve radyolojik raporu, ortopedi bölümünce lomber ponksiyon yapılabileceğine dair onay yazısı gerekmektedir. İntrakraniyal enfeksiyon bulgusu olan, solunum desteği veya oral alım desteği gereken hastalarda ilaç kullanımına Sağlık Bakanlığı tarafından onay verilmemektedir. İlgili kuruma başvuru sırasında ek olarak bir motor kapasite değerlendirme testi olan HFMSE sonuçları gönderilmektedir. Hastaların ilaç onayı Sağlık Bakanlığı tarafından ilk 4 yükleme dozu için verilmekte olup, 4. doz sonrası motor kapasite skorundaki 3 puanlık artış tedavi lehine değerlendirilmektedir. İlk yayınlanan tebliğ uyarınca HFMSE skorunda 3 puanlık artış gösteren hastalarda idame tedaviye devam edilmiştir. 20.08.2020 tarihinde yayınlanan sağlık uygulama tebliği ile tedavi protokolü Sağlık Bakanlığı tarafından ENDEAR [69] çalışması uyarınca düzenlenmiş ve 08.02.2022 tarihinde yapılan tebliğ ilacın devamı için motor kapasite skorunda değişiklik aranması şartı kaldırılmıştır. 25.06.2023 tarihinde resmî gazetede yayınlanan son sağlık uygulama tebliği ile nusinersen tedavisi geri ödeme kapsamına alınmış ve "İlaç Kullanım Onayı" gerekliliği kaldırılmıştır.

Önerilen prosedür uygulama başına intratekal 12 mg'dır (5mL). Anestezi gerektirmeden, steril koşullarda yapılan lomber ponksiyon (LP) işleminin ilk aşamasında 5 mL beyin omurilik sıvısı boşaltılır, sonrasında nusinersen spinal anestezi

iğnesi kullanarak 1 ila 3 dakika içinde intratekal bolus enjeksiyon ile hastaya uygulanır [69, 72]. Tedavi sonrası hasta bir süre dinlendirilir ve aynı gün içinde taburcu edilir. İlacın verilme şekli nedeniyle LP ile ilişkili yan etkiler rapor edilmiştir. En yaygın yan etkiler; sırt ağrısı (%41) ve intrakraniyal hipotansiyon (%41) olarak belirtilmiştir. Bu yan etkilerin çoğu lomber ponksiyondan sonraki 5 gün içinde meydana gelmiştir [72, 75, 92-96].

2.7.2. Onasemnogene Abeparvovec

Gen yerine koyma tedavisi, *SMN1* geninin adeno-ilişkili virüs 9 (AAV9) vektörü aracılığıyla tek doz intravenöz yolla uygulanması prensibine dayanmaktadır [97]. Onasemnogene abeparvovec uygulaması sonrasında, infüze edilen transgenin hücrelerde, özellikle motor nöronlarda, protein ekspresyonunu sağlaması amaçlanır. Onasemnogene abeparvovec etkinliğini ve güvenliğini değerlendiren ilk klinik çalışma olan START çalışmasına yaş aralığı yenidoğandan 9 aya kadar uzanan 15 SMA tip 1 tanılı bebek dahil edilmiştir [71]. İzlem sonrasında, 20 aya ulaşan hastaların 11'inin konuşabildiği ve oturma fonksiyonu kazandığı gözlenmiştir. Ek olarak, hiçbir hastada solunum desteği gerekmemiştir [71]. Bu sonuçlar, 2019 yılında 24 aya kadar SMA'lı bireylerin tedavisi için onasemnogene abeparvovec (*Zolgensma*®) tedavisinin FDA tarafından onaylanmasını sağlamış, takiben dünya çapında birçok başka ülke endikasyonlarla ilacı onaylamıştır. Amerika [98] ve Avrupa'da [99] birbirini takip eden iki büyük, açık etiketli, çok merkezli faz III çalışma (STRIVE ve STRIVE-EU) da START çalışması [71] ile benzer sonuçlara ulaşmıştır. Çalışmalarda katılımcı bebeklerin %90'dan fazlası 18 aylıkken hayatta kalmış ve motor fonksiyonda önemli kazanımlar elde etmiştir [98, 99]. Ayrıca, onasemnogene abeparvovec tedavisinin onaylanmasından bu yana yayınlanan gerçek yaşam verileri mevcut bulguları desteklemektedir [100-102].

2.7.3. Risdiplam

Oral yolla alınan küçük bir molekül olan risdiplam (Evrysdi ®), *SMN2* gen ürünü pre-mRNA'ya bağlanarak splicing süreci için gerekli olan küçük nükleer ribonükleoprotein (SnRNP) komplekslerinde konformasyonel değişikliğe neden olur [103]. Nusinersen benzeri bu mekanizma splicing sürecinde ekzon 7'nin atlanmasını önler ve bu modülasyon sayesinde SMN protein ekspresyonunu artırır [70, 104, 105].

İki aydan büyük tüm SMA hastalarında kullanım için iki büyük klinik araştırmanın tamamlanmasının ardından onaylanmıştır [70, 104, 105]. İlk çalışmada (FIREFISH), SMA tip 1 hastalarında, baş kontrolü ve bağımsız oturma gibi motor gelişim basamakları başarılmış, sağkalım ve fonksiyonel iyileşme önemli ölçüde artmıştır [70]. 2 ile 25 yaş arasındaki SMA tip 2 veya ambulans tip 3 hastalarının dahil edildiği ikinci çalışmada (SUNFISH), tedavi alan hastalarda hem motor fonksiyon skorlarında iyileşme sağlamış hem de kandaki SMN protein miktarında artış gözlemiştir [104, 105].

2.8. HASTALIK AKTİVİTESİNİN TAKİBİ

SMA hastalarında daha fazla *SMN2* kopya sayısına sahip olma daha iyi fenotip ile ilişkilendirilmiş ve önceki bölümlerde de değinildiği gibi *SMN2* kopya sayısı uzun yıllardır SMA tiplendirmesinde kullanılmıştır [10, 25, 26]. Ancak artan klinik çalışmalar ve teknolojik gelişmeler; hastalık seyrini öngörmede *SMN2* kopya sayısının yetersizliğini ortaya koymuştur. Klinisyenler hem hastaların takibinde kullanılacak ve hem de klinik çalışmalarda sonlanım noktası oluşturacak valide edilmiş motor fonksiyonel değerlendirme ölçeklerine yıllar içerisinde ihtiyaç duymuştur.

SMA tiplerine ve hastaların yaş gruplarına göre kullanılan hastalık aktivitesini değerlendiren motor fonksiyon ölçekleri mevcuttur (**Tablo 2.2**). Bu ölçeklerden alınan puanların düzeyine aşına olmak, klinik araştırma verilerini yorumlamada ve moleküler terapilere verilen terapötik yanıtı değerlendirmede yararlıdır. Kullanılmakta olan fonksiyonel sonuç ölçütlerinden birkaçı SMA için valide edilmiştir. Ek olarak herhangi bir nöromusküler bozukluğu olan hastalar için valide edilmiş ölçekler de kullanılabilir [106-112].

“Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE)”, tip 2 ve 3 tanılı hastalarda hastalık ilerlemesini değerlendirmek için onaylanmış SMA'ya özgü bir ölçektir [107, 113]. 0 ile 66 puan aralığında skorlanan 33 maddeye sahiptir ve her bir madde 0 ile 2 arasında puanlanır. Daha yüksek puanlar, daha gelişmiş motor işlevi gösterir [107]. Günümüzde erişkin popülasyonda tedavi yanıtını değerlendirmede HFMSSE ölçeğindeki 3 puanlık artış, klinik anlamlı yanıt olarak kabul edilmektedir [69, 72]. Ancak, tedavi öncesi yüksek skorlara sahip olan hastalarda bu artışı göstermek her zaman mümkün olmamaktadır [87]. Diğer taraftan, skorlama sisteminin

tedavi sonrası ortaya çıkan minör faydalanmaları göstermede yetersiz kaldığı klinisyenler arasında son dönemde tartışılmaktadır.

Tablo 2.2. SMA Hastalarında Motor Fonksiyonel Durumu Değerlendiren Ölçekler

Motor Ölçek	Değerlendirilen Fonksiyonlar	Hedef Popülasyon
CHOP-INTEND	Baş kontrolü, yuvarlanma, üst ve alt ekstremitte kaba motor fonksiyonları, aksiyal kas gücü ve tonus	SMA Tip 1 (<i>yenidoğanlar ve bebekler</i>)
HINE-2	Baş kontrolü, oturma, kavrama, tekmeleme, yuvarlanma, sürünme, ayakta durma, yürüme	SMA Tip 1 ve Tip 2 (<i><24 ay</i>)
HFMSE	Yuvarlanma, oturma, yatar pozisyondan oturma pozisyonu alma, diz çökme, ayakta dururken diz çökme pozisyonu alma, çömelme, zıplama, merdiven çıkma ve inme	SMA Tip 2 ve Tip 3 (<i>>24 ay</i>)
MFM	Üst ve alt ekstremitte kaba ve ince motor fonksiyonları, yuvarlanma, yatar pozisyondan oturma pozisyonu alma, otururken ayağa kalkma, koşma, zıplama	Nöromusküler Hastalıklar (<i>3 ve 64 yaş arası</i>)
RULM	Üst ekstremitte kaba ve ince motor fonksiyonları	SMA Tip 2 ve Tip 3 (<i>> 3 yaş</i>)
6DYT	25 metrelik döngüler şeklinde 6 dakika içerisinde yürüyebildiği maksimum mesafeye ulaşma	SMA Tip 3

CHOP-INTEND: Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders
HINE-2: Hammersmith Infant Neurological Examination Section-2
HFMSE: Hammersmith Functional Motor Scale Expanded
MFM: Motor Function Measure
RULM: Revised Upper Limb Module
6DYT: 6 Dakika Yürüme Testi

Nöromusküler hastalıklarda klinik takip amacıyla valide edilmiş ve son zamanlarda ambulatuvar SMA tip 3 tanılı hastalarda kullanımı artan bir diğer ölçek ise 6 dakika yürüme testidir (6DYT). Ekibimiz tarafından yayınlanan bir çalışma da bu testte kaydedilen 30 metrelik artışın ambulatuvar hastalarda klinik anlamlı iyileşmeyi gösterdiğini vurgulamaktadır [112]. Benzer şekilde, 3 yaş üstü tüm SMA hastalarında “Revised Upper Limb Module (RULM)” testi hasta takibinde klinisyenler tarafından sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Üst ekstremitte motor fonksiyonlarını değerlendiren bu test özellikle tekerlekli sandalyeye bağımlı tip 2 ve 3 hastalarında, tedavi sonrası

linik yanıtın değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır [109]. Ancak, bu ölçek için anlamlı klinik yanıtı ön gören bir sınır puan belirlenmemiştir.

Solunum yetmezliği, SMA'lı genç hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir, ancak bu yaş grubunda solunum fonksiyon testleri zor ve güvenilir değildir. Erişkin yaş grubunda klinik araştırmalarda hasta izleminde solunum fonksiyon testleri de kullanılmaktadır [11].

2.9. BİYOBELİRTEÇLER

SMA hastalarındaki fenotipik heterojenite; erken ve doğru tanı, prognoz, hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi ve tedavi yanıtının izlenmesinde zorluklara neden olabilmektedir. Bu dinamik ortamda, hastalar için klinik karar vermeyi kolaylaştırmak, günümüzde sayısı artan tedavilerden hastaya uygun olanını belirlemek ve tedavi yanıtını öngörebilmek için, objektif bir ölçü olabilecek biyobelirteçlere olan ihtiyaç daha önce olmadığı kadar önem taşımaktadır [114]. Mevcut motor ölçekler hastaların takip ve tedavi izlem sürecini değerlendirmede yetersiz kalmış ve tedavi seçeneklerinin gelişmesi ile tedavi yanıtını ön görebilmek adına biyobelirteç çalışmaları hız kazanmıştır. Kan ve BOS analizlerine dayanan moleküler biyobelirteçlerin yanı sıra görüntüleme tabanlı dijital biyobelirteçler de dahil olmak üzere birçok kaynak tartışılmıştır [115].

Biyobelirteçler, sağlıklı bireylere kıyasla etkilenen bireyleri tanımlamak için hastalık kohortlarında anlamlı şekilde farklı seviyede bulunmalı, yüksek hassasiyet, özgüllük, kesinlik ve tekrarlanabilirlik özelliklerine sahip olmalıdır. Ek olarak, biyobelirteçler hastalık epifenomeninden ziyade hastalık patolojisini yansıtmalı ve ideal olarak hedef popülasyonda kolaylıkla, hızla ve minimum masrafla ölçülmelidir [114]. Bu ilkeler esas alındığında günümüzde çalışmalar kan veya BOS analizi ile saptanabilecek biyobelirteçler üzerinde durmaktadır [115]. Bugüne kadar, SMA yönetiminde valide edilmiş motor fonksiyon ölçekleri kullanılmakta ve klinik deneyimlerde bu ölçümlerin yetersizliği vurgulanmaktadır. Büyük çabalar gösterilmesine rağmen, şimdiye kadar SMA hastalarında klinik rutinde kullanılabilecek hiçbir tanısal ve/veya tedavi yanıtını gösteren kabul görmüş bir biyobelirteç yoktur.

2.9.1 Elektrofizyolojik Biyobelirteç Çalışmaları

SMA tipini öngörmeye *SMN2* kopya sayısının önemine ek olarak, motor nöron işlevine ilişkin elektrofizyolojik ölçümlerin geliştirilmesi ve doğrulanması, hastaları izlemeyi kolaylaştırmış ve biyobelirteç çalışmalarına konu olmasını sağlamıştır [11]. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdü, kabaca belirli bir kası besleyen bozulmamış motor nöronların sayısının ölçüsüdür. BKAP amplitüdü klinik şiddet, yaş ve fonksiyon ile ilişkilidir ve daha hafif hastalığı olanlarda normale yakındır [116, 117]. Hastalık ilerledikçe BKAP amplitüdü azalır. Maksimum BKAP amplitüdü, *SMN2* kopya sayısı üçten az olan hastalarda kliniğin ağırlığı dolayısıyla daha düşüktür [118]. SMA'lı hastalarda BKAP boyutu ve işlevi arasındaki korelasyonun, prognoz için bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır [11].

Motor birim sayısı tahmini (“motor unit number estimation”, MUNE), bir kas veya kas grubunu inerve eden motor nöronların sayısının bir tahminidir [119]. SMA hasta popülasyonlarına çeşitli MUNE varyasyonları uygulanmıştır ve hepsi benzer motor ünite kaybı özellikleri göstermiştir [120, 121].

BKAP ve MUNE, klinik şiddet, yaş ve fonksiyonel durum ile iyi bir korelasyon göstermiştir. Ancak, bu çalışmalara dahil edilen çoğu hastalarda hastalık süresi genellikle uzundur [122]. Daha da önemlisi, erken dönemde incelenen hastalarda da motor ünite fonksiyonunun nispeten korunduğu gözlenmiştir [118, 123]. Bu nedenle, farklı hastalık evrelerinde motor ünite kaybının zamanlaması ve oranı halen belirsizliğini korumaktadır [122].

2.9.2. SMN Protein Düzeyi

Ön boynuz motor nöronlarında yüksek seviyelerde fonksiyonel SMN proteini (SMN-P) varlığı, daha hafif SMA fenotipi ile ilişkilendirilmiştir [32]. Bu nedenle SMN-P seviyelerinin hem prognostik hem de farmakodinamik izleme için en doğru biyobelirteç olacağı yıllardır tartışılmaktadır [124]. Özellikle, SMN-P seviyelerinde artış ile etki gösteren tedavilerin onaylanmasıyla bu çalışmalar hız kazandırmıştır [104, 125]. Bununla birlikte, SMN-P'yi rutin olarak değerlendirmenin ve yorumlamanın en iyi yolu hakkında henüz fikir birliği sağlanmamıştır. Farklı gruplar, SMN-P ekspresyonunun farklı doku tipleri arasında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur [126, 127].

Bazı çalışmalar, periferik kandaki SMN-P düzeylerinin, daha ağır fenotipli hastalarda denervasyonun şiddeti ve genel hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğunu bulmuştur [128-131]. Ancak farklı gruplar, SMN-P kan düzeyleri ile iskelet kası ve spinal kord SMN-P düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon bulamamıştır [132, 133]. SMN-P seviyeleri kanda santral sinir sistemine oranla daha düşüktür [134] ve motor nöronlardaki SMN mRNA düzeyindeki artış ile periferik SMN-P düzeyinde değişiklik saptanamamıştır [135]. Merkezi sinir sistemi ve periferik protein seviyeleri arasındaki bu tutarsızlık göz önüne alındığında, SMN-P'nin biyobelirteç amacıyla kullanımını sınırlıdır.

2.9.3. Beyin Omurilik Sıvısı Proteomik Analizi

Beyin omurilik sıvısı proteomik analizi, proteinleri mass-spektrometrisi kullanarak tanımlamak ve ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu yaklaşım, SMA dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklar için yeni biyobelirteçler keşfetme potansiyeline sahiptir. BOS proteomik analizi halen aktif bir araştırma alanıdır ve rutin klinik kullanım için kesin bir biyobelirteç seti oluşturulamamıştır [136-138].

2.9.4. Nörodejenerasyon ve Nörörejenerasyon İlişkili Biyobelirteçler

Nörofilamanlar (NF), nöronlar için yapısal destek ve bütünlük sağlayan dokuya özgü ara filaman sınıfıdır [139]. Nörofilamanlar, 8 aya kadar yarı ömre sahip dört alt birimden oluşur ve hem kanda hem de BOS'ta değerlendirilebilir [140, 141]. Bu durum, var olan nöronal hasarı göstermek için kolayca erişilebilir bir belirteç haline gelmelerine yol açmıştır. Özellikle NF'lerin fosforlanmış ağır zinciri (pNFH) ve hafif zinciri (NFL) çalışmalarda incelenmiştir [115]. Nöronal hasarla salınan bu molekül ALS gibi çok sayıda nörodejeneratif hastalıkta yüksek seviyelerde saptanmıştır [140, 141].

Beyin omurilik sıvısı pNFH seviyeleri, SMA tip 1 hastalarında [69, 142] ve özellikle 4 yaşından küçüklerde yüksek bulunmuştur [143]. Bu çalışmalarda, yüksek pNFH seviyeleri, tüm yaş gruplarında erken başlangıç ve daha düşük motor fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir ve zamanla düzeyleri düşmüştür [69]. Bu bulgular, tedavinin başlama zamanına bakılmaksızın nusinersen altında pNFH düzeylerinin düştüğünü gösteren CHERISH çalışmasında doğrulanmıştır [144]. Bu düşüş, nusinersen ile tedavi edilen hastalarda daha hızlı olmuştur [144]. SMA'lı pre-sembiotik bebeklerde,

pNFH, gelecekteki motor gelişim basamaklarına ulaşma başarısı ile ilişkilidir [145]. Nörofilamanlar, SMA'lı bebeklerde umut verici biyobelirteçler olsa da SMA tip 2-4 hastalarında çelişkili veriler vardır. Erişkin SMA'lı bireylerde yapılan analizler, sağlıklı kontroller ve hastalar arasında serum pNFH ve NFL seviyeleri açısından ne başlangıçta ne de tedavi sonrasında bir fark göstermemiştir [146-148]. Özellikle pediatrik yaş grubunda yapılan çalışmalarda kontrol grubuna oranla yüksek seviyede saptanan ve tedavi ile düşüş gösteren BOS NF düzeyi; erişkin yaş grubunda benzer bir fenomeni yansıtmamaktadır. Bu nedenle NF'ler, erişkin SMA hastaları için uygun bir biyobelirteç gibi görünmemektedir.

Nörodejenerasyon ve nörorejenerasyonun diğer moleküler belirteçleri olan Tau proteinleri ve β -amiloid peptitler (A β 42 ve A β 40) nörodejeneratif hastalıklarla yaygın olarak ilişkilendirilmiştir [115]. Her ikisi de SMA hastalarında birkaç çalışmada değerlendirilmiştir. *Winter ve ark.* SMA tip 1'li bebeklerde, başlangıçta artmış olan BOS fosforile-Tau (pTau) değerlerinin nusinersen tedavisi sırasında azaldığını göstermiş [149] ve bu veriler tüm pediatrik SMA alt tipleri için desteklenmiştir [146, 149]. β -Amiloid peptitlerin, özellikle A β 42'nin, muhtemelen sinaptik aktivitenin düzensizliği [150] veya aksonal dejenerasyon yoluyla [151], Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır. A β 42, tip 2 ve 3 yetişkin SMA hastalarından oluşan küçük bir kohortta başlangıçta artış göstermemesine rağmen tedavi altında artış göstermiştir [152]. Diğer çalışmalar ise nusinersen altında stabil A β 42 ve A β 40 seviyeleri göstermiştir [75]. Bu nedenle klinik kullanıma girmemiştir.

2.9.5. Glial Biyobelirteçler ve Nöroinflamasyon

İnsan beynindeki hücrelerin tahminen %50'si, birçok nörodejeneratif hastalıkta önemli rol oynayan glia hücrelerinden oluşur. SMA'da nispeten keşfedilmemiş olmasına rağmen, hastalığın seyrinde glial tutulum olduğuna dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır [153]. Glial hücrelerin SMA patogenezinin artan nöroinflamasyon, sinaptik düzensizlik ve anormal immün sistem aktivitesi gibi mekanizmalarla dahil olduğu düşünülmektedir [153]. Ayrıca, astrositlerde artan SMN protein seviyelerinin motor nöron sağkalımını artırdığı gösterilmiştir [115].

“Glial fibrillary acidic protein” (GFAP), astrosit aktivasyonu ve nöroinflamasyonu değerlendirebilecek potansiyel biyobelirteç olarak SMA hastalığında araştırılmıştır [154]. GFAP astrositlerde bulunan bir ara filament proteindir ve astroglial aktivitenin bir göstergesidir. SMA hastalarındaki motor nöron dejenerasyonunun astrositlerde sekonder reaktif değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir [142]. *Olsson ve ark.* SMA tip 1 tanılı hastalarda BOS GFAP düzeylerinin kontrollere göre önemli ölçüde arttığını göstermiştir [155]. Ayrıca, başka bir çalışmada GFAP seviyeleri hastalığın ciddiyeti ile korelasyon göstermiştir [142]. Bu durum, BOS GFAP tayininin SMA için potansiyel bir biyobelirteç adayı olduğunu düşündürmektedir. Ancak, bulguları doğrulamak, tedavi ile değişen düzeylerini göstermek ve SMA için bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesini sağlamak için sınırlı sayıda olan bu çalışmaları daha fazla araştırma sonucuyla desteklemek gerekmektedir. Ancak, henüz biyobelirteç çalışmalarında kendine yer bulamamıştır ve araştırmalara açık bir alandır.

“Glial cell-derived neurotrophic factor” (GDNF), motor nöronların hayatta kalması ve korunmasında önemli rol oynayan bir nörotrofik faktördür. SMA patogenezindeki rolü araştırma konusu olmuştur [153]. SMA hastalarında GDNF düzeylerini inceleyen tek bir çalışma mevcut olup, SMA tanılı infantlarda BOS GDNF düzeyinde önemli artış saptanmıştır [156]. Fakat tedavi sonrası BOS GDNF düzeylerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

“Chitinase-3 like-protein1” (CHI3L1) olarak da bilinen YKL-40, çeşitli inflamatuvar süreçler ve doku yeniden modelleme süreçlerinde yer alan bir glikoproteindir [157]. Nöroinflamasyon durumunda astrositlerde eksprese edildiği ve bu nedenle astroglial aktivitenin bir belirteci olduğu tartışılmaktadır [157]. SMA tip 1 tanılı bebeklerin serum YKL-40 seviyelerinde artış gözlenmiştir [158]. Tip 2 ve 3 tanılı hastalarda yapılan bir başka çalışmada da tedavi altında BOS YKL-40 seviyelerinde azalma kaydedilmiştir [157, 159]. Mevcut bulguların desteklenmesi ve tedavi ile BOS düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Uzun yıllardır nörodejeneratif bir hastalık kabul edilen SMA'nın patogenezinin inflamasyonun katkısı son dönemde tartışma konusu olmuştur. Özellikle günümüzde glial aracılı nöroinflamasyonun patogeneze katkısı olduğu üzerinde durulmaktadır.

Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinlerin SMA hastalarının kan veya doku örneklerinde farklı SMA alt tiplerinde arttığı bildirilmiştir [115, 160]. İnflamatuvar belirteçlerin günümüzde kullanımını sınırlı olup, çalışmalarda tutarlı sonuçlara henüz ulaşamamıştır. Buna ek olarak, tedavi sonrasında bu belirteçlerin düzeyinde meydana gelen değişikliklerle ilgili de yeterli veri bulunmamaktadır.

Benzer bir grup hastalık olan ALS patofizyolojisinde de inflamasyon ve glial hücrelerin rolü halen araştırılmakta ve elde edilen sonuçlarla desteklenmektedir [161]. Hayvan çalışmalarında GDNF ve GFAP'ın motor nöron sağ kalıma etkisi vurgulanmaktadır [161]. ALS hastalarında kontrollere kıyasla BOS'da GDNF seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir [162, 163]. İnflamatuvar patogeneze rol alan moleküllerden; interlökinler, stimulan faktörler, TNF- α ve interferon gamma daha çok ALS hastaları üzerinde çalışılmıştır. Ek olarak, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi bazı inflamatuvar moleküllerin ALS hastalarının BOS örneklerinde arttığı gösterilmiştir [164-166]. Benzer şekilde, astrositler tarafından eksprese edilmesine rağmen inflamatuvar patogeneze üzerine etkili olan YKL40'ın ALS hastalarının BOS örneklerinde arttığı tespit edilmiştir [167-170].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, SMA hastalığı patogenezinin katkısı hayvan modelleri ile gösterilmiş (*Bknz: 2.9.4 Glial Biyobelirteçler ve Nöroinflamasyon*) glial hücre ve nöroinflamasyon ilişkili dört molekülü (GFAP, GDNF, CH3L1 (YKL40) ve IL-6) değerlendirmektedir. Moleküllerin patogeneze katkısını doğrulamak ve SMA için tanıs olabilecek molekülleri saptamak amaçlanmıştır. Ek olarak, moleküllerin nusinersen tedavisi öncesi ve tedavi süresince BOS örneklerindeki değişkenliği ve bu değişkenliğin kliniğe yansması araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarının tanıs, prognostik ve terapötik biyobelirteçlerin tanımlanmasına ve kişiye özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Prospektif, gözlemsel ilaç çalışması olarak tasarlanan bu araştırmanın yürütülebilmesi için Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (*KA-21040*) ve Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan (*21-AKD-94*) onay alınmıştır. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Türk Nöroloji Derneği "proje destek bursu" sağlamıştır.

3.1. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Araştırma 01.03.2019-01.03.2023 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı bünyesindeki Nöromusküler Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüş olup; üniversitemiz Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı veri değerlendirme ve işleme sürecine katkı sağlamıştır.

3.2. ARAŞTIRMANIN EVRENİ, ÖRNEKLEMİ VE ARAŞTIRMA GRUBU

Araştırmanın evreni SMA tip 2 veya tip 3 tanısı genetik olarak doğrulanmış ve söz konusu çalışmadan bağımsız olarak, Sağlık Bakanlığı tarafından nusinersen intratekal tedavi onayı verilen ve tedavi süreci kliniğimiz bünyesinde yürütülen hastalardan oluşmaktadır. Çalışmaya 24 SMA tanılı hasta dahil edilmiş olup; kontrol grubunda 12 kişi yer almaktadır.

3.2.1. Hasta Grubu

Hasta Grubu Dahil Edilme Kriterleri:

- ≥ 18 yaş olmak
- SMA tanısı genetik olarak doğrulanmış olmak
- SMA klinik bulguları tip 2 veya tip 3 ile uyumlu olmak
- Nusinersen tedavisi Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış olmak
- Nusinersen yükleme dozlarını CHERISH çalışma protokolüne göre tamamlamış (0, 29, 85 ve 274'üncü günler) ve ilk idame tedavi dozunu almış olmak

Hasta Grubu Dışlama Kriterleri:

- Yeterli BOS örneğinin temin edilememiş olması
- Hastanın rızasının bulunmaması
- Hastanın intratekal tedavisi için gereken lomber ponksiyon işleminin standart prosedürlerle gerçekleştirilememiş olması (skopi altında yapılması, rezervuar gerekmesi veya katater takılması gibi)

3.2.2. Kontrol Grubu

Çalışmanın kontrol grubuna dahil etmek amacıyla; hastanemiz nöroloji polikliniğine baş ağrısı şikâyetiyle başvuran ve ayırıcı tanı amacıyla (psödötümör serebri vb. hastalıklar açısından) lomber ponksiyon işlemi planlanan hastalar değerlendirilmiştir. Ayırıcı tanı amacıyla yapılan tetkikler ve BOS inceleme sonuçları değerlendirildiğinde, başvuru sırasında ve bir yıllık takipte herhangi bir nörolojik hastalık tanısı konmamış kişiler çalışmanın kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Kontrol Grubu Dahil Edilme Kriterleri:

- ≥ 18 yaş olmak
- Kişiye baş ağrısı şikâyeti nedeniyle başvurusu sırasında ayırıcı tanı için BOS örnekleme yapılması

Kontrol Grubu Dışlama Kriterleri:

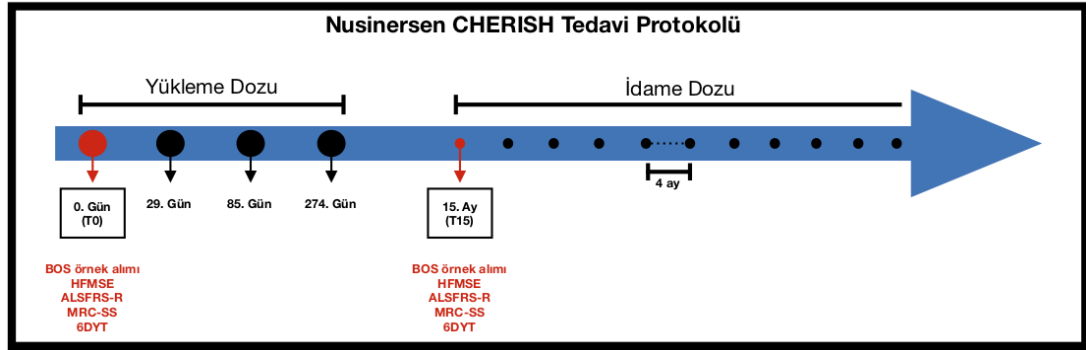
- Herhangi bir nörolojik hastalık tanısı almış olması
- Kişinin herhangi bir dahili hastalık tanısı bulunması
- Kişinin herhangi bir ilaç kullanımı olması

3.3. ARAŞTIRMANIN YÖNTEMİ VE VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.3.1. Hasta Grubu (SMA)

Dahil edilme ve dışlama kriterlerine göre 24 SMA hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Dahil edilen hastaların kimlik bilgileri gizlenerek; demografik verileri, hastalık başlangıç yaşı, SMA tipi, *SMN2* kopya sayıları ve maksimum motor kapasiteleri kaydedilmiştir.

Nusinersen tedavisi planlanan hastalar çalışma kapsamında iki farklı zaman noktasında değerlendirilmiştir (Şekil 3.1);



Şekil 3.1. Hasta Grubuna Uygulanan Standart Tedavi Protokolü ve Çalışma Kapsamında Hasta Örneklerinin Değerlendirildiği Zaman Noktaları

- **T0 (0.gün):** İlk zaman noktası, hastaların tedavi alacağı gün yani 0.gün olarak belirlenmiştir. İntratekal nusinersen uygulaması öncesi boşaltım amacıyla alınan 5mL BOS numunesi Hacettepe Üniversitesi Biyobankası'na afileye olan Nöromusküler Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. İlgili zaman noktasında hastaların motor fonksiyonel kapasitelerini yansıtan; HFMSE, "ALS Functional Motor Scale Revised" (ALSFRS-R) ve "Medical Research Council sum score" (MRC-SS) ölçek sonuçları kaydedilmiştir. Ek olarak, ambulatuvar hastalarda 6 dakika yürüme testi mesafesi not edilmiştir.
- **T15 (15.ay):** İkinci zaman noktası olarak 15. ay belirlenmiştir. Bu zaman noktasında hastalar dört yüklenme dozu sonrası, ilk idame tedaviyi (5.doz) almaktadır. Bu zaman noktasının seçilmesinin nedeni molekülün yüklenme

dozu sonrası BOS'ta kararlı durum ("steady state") konsantrasyonuna ulaşmasıdır. 5.doz intratekal nusinersen uygulaması öncesi boşaltım amacıyla alınan 5mL BOS benzer koşullarda saklanmıştır. İlgili zaman noktasında T0'da test edilen motor ölçekler tekrarlanmıştır.

T0 ve T15 zaman noktalarında toplanan BOS numuneleri -80°C derin dondurucuda saklanmış ve çalışmanın tamamlanmasını takiben belirlenen dört molekülün (GFAP, GDNF, CH3L1 (YKL40) ve IL-6) düzeyi ticari ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) kitleri ile analiz edilmiştir. ELISA deneylerine başlamadan önce, BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*) tayin kiti kullanılarak kalorimetrik yöntemle BOS numunelerindeki total protein konsantrasyonunu belirlenmiştir.

3.3.2. Kontrol Grubu

Dahil edilme ve dışlama kriterleri uyarınca 12 katılımcı kontrol grubuna dahil edilmiştir. Katılımcıların kimlik bilgileri gizlenerek demografik bilgileri kaydedilmiştir. Tetkik amacıyla incelenmesi planlanan BOS örneğinden çalışma için ayrılan numune santrifüj edilerek; Hacettepe Üniversitesi Biyobankası'na afileye olan Nöromusküler Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışmanın tamamlanmasını takiben belirlenen dört molekülün (GFAP, GDNF, CH3L1 (YKL40) ve IL-6) BOS düzeyleri ticari ELISA kitleri ile analiz edilmiştir. ELISA deneylerine başlamadan önce, BCA tayin kiti kullanılarak kalorimetrik yöntemle BOS numunelerindeki total protein konsantrasyonunu belirlenmiştir.

3.3.3. ELISA Analizleri

ELISA deneylerine başlamadan önce BOS örneklerindeki total protein konsantrasyonunu belirlemek için BCA protein tayin kiti kullanıldı.

- **BCA protein tayini**

BOS örneklerindeki total protein konsantrasyonunun belirlenmesi için insan BCA protein tayin kiti kullanıldı (*ab102536, Abcam*).

Örneklerin hazırlanması: BOS örnekleri -80°C 'den çıkarılarak buz üzerinde çözümleri sağlandı. Örnekler 1:20 oranında seyreltilerek çalışıldı.

Çözeltilerin hazırlanması: Protein tayini için kullanılacak tüm çözeltiler ve malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra çalışmaya başlandı. Kitin içeriğinde yer alan çalışma çözeltisi için 1:50; Copper Reagent: BCA Reagent karıştırılarak çalışılacak örnek sayısına göre hazırlandı. Standartlar deney öncesinde taze olarak hazırlandı. 1 mg /mL konsantrasyondaki stok standart çözeltisinden 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.

Deney protokolü: Tüm standartlar iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plağın kuyulara standart ve örnekler 50 μL eklendi. Ardından 100 μL hazırlanan çalışma çözeltisi eklendi. Plağın üzeri kapatılarak plaka çalkalayıcıda çalkalanarak 60°C 'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaka oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığına gelen plaka optik okuyucuya (*SpectraMax Plus, Molecular Devices, US*) yerleştirilerek, Softmax Pro programında 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Excel programında standart eğri grafiği çizilerek elde edilen formül ile BOS örneklerindeki total protein konsantrasyonu hesaplandı.

- **İnsan GFAP ELISA**

BOS örneklerindeki GFAP konsantrasyonunun belirlenmesi için insan GFAP ELISA kiti kullanıldı. (ab288175, Abcam)

Örneklerin hazırlanması: BOS örnekleri -80°C 'den çıkarılarak buz üzerinde çözümleri sağlandı. Örneklerde seyreltme yapılmadı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak tüm çözeltiler ve malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra çalışmaya başlandı. Kitte yer alan yıkama tampon çözeltisi distile su ile 1:10 konsantrasyona seyreltildi. Yakalama antikoru (Capture Antibody), detektör antikor (Detector Antibody) ve antikor seyreltici CP (Antibody Diluent CP) çözeltileri kit

içeriğinde belirtilen oranlarda eklenerek antikor kokteyl çözeltisi hazırlandı. Standartlar deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Kit içeriğindeki liyofilize halde bulunan GFAP standartı numune seyreltici NS (Sample Diluent, NS) ile 400 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok standart çözeltisinden 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.625 ng/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.

Deney protokolü: Tüm standartlar ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plağın kuyulara standart ve örnekler 50 µL eklendi. Ardından 50 µL antikor kokteyl çözeltisi eklendi. Plağın üzeri kapatılarak plaka çalkalayıcıda bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi (400 rpm). Plak 350 µL yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandı ve kurutuldu. 100 µL reaksiyon çözeltisi (TMB Development Solution) eklenerek plaka çalkalayıcı üzerinde (400 rpm), karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µL reaksiyon durdurucu çözelti (Stop Solution) eklenerek bir dakika plaka çalkalayıcıda karıştırıldı (400 rpm). Plaka, optik okuyucuya (*SpectraMax Plus, Molecular Devices, US*) yerleştirilerek, Softmax Pro programında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Excel programında standart eğri grafiği çizilerek elde edilen formül ile BOS örneklerindeki GFAP konsantrasyonu hesaplandı.

- **İnsan GDNF ELISA**

BOS örneklerindeki GDNF konsantrasyonunun belirlenmesi için insan GDNF ELISA kiti kullanıldı (*NE010012201, Nepenthe*).

Örneklerin hazırlanması: BOS örnekleri -80°C'den çıkarılarak buz üzerinde çözülmeleri sağlandı. Örneklerde seyreltme yapılmadı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak tüm çözeltiler ve malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra çalışmaya başlandı. Kitte yer alan yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1:25 konsantrasyona seyreltildi. Standartlar deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Kit içeriğindeki 24

ng/mL GDNF stok standartı aynı miktarda standart seyreltici (Standart Diluent) ile 12 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde standart çözeltisi hazırlandı. Ardından hazırlanan standart çözeltisinden 6 ng/mL, 3 ng/mL, 1.5 ng/mL, 0.75 ng/mL, 0.38 ng/mL, 0.19 ng/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak diğer standartlar hazırlandı.

Deney protokolü: Tüm standartlar ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plağın kuyulara standart ve örnekler 40 µL eklendi. Ardından 10 µL anti-GDNF antikoru eklendi. Sonrasında kontrol kuyuları hariç tüm kuyulara 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Plağın üzeri kapatılarak bir saat 37°C’de inkübe edildi. Plak 350 µL yıkama tampon çözeltisi ile 5 defa yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 50 µL substrat çözeltisi A ve 50 µL substrat çözeltisi B eklenerek karanlıkta, 37°C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 50 µL reaksiyon durdurucu çözelti (Stop Solution) eklendi. Plaka 10 dk içinde, optik okuyucuya (*SpectraMax Plus, Molecular Devices, US*) yerleştirilerek, Softmax Pro programında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Excel programında standart eğri grafiği çizilerek elde edilen formül ile BOS örneklerindeki GDNF konsantrasyonu hesaplandı.

- **İnsan CH3L1 (YKL-40) ELISA**

BOS örneklerindeki GFAP konsantrasyonunun belirlenmesi için insan YKL-40 ELISA kiti kullanıldı (*ab255719, Abcam*).

Örneklerin hazırlanması: BOS örnekleri -80°C’den çıkarılarak buz üzerinde çözülmeleri sağlandı. 1:50 oranında seyreltme yapıldı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak tüm çözeltiler ve malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra çalışmaya başlandı. Kitte yer alan yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1:10 konsantrasyona seyreltildi. Yakalama antikoru (Capture Antibody), detektör antikor (Detector Antibody) ve antikor seyreltici 4BI (Antibody Diluent 4BI) çözeltileri kit içeriğinde belirtilen oranlarda eklenerek antikor kokteyl çözeltisi hazırlandı. Standartlar deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Kit içeriğindeki liyofilize halde bulunan GFAP standartı numune seyreltici NS (Sample

Diluent NS) ile 24 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok standart çözeltisinden 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187.5 pg/mL, 93.8 pg/mL, 46.9 pg/mL, 23,4 pg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.

Deney protokolü: Tüm standartlar ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plağın kuyulara standart ve örnekler 50 µL eklendi. Ardından 50 µL antikor kokteyl çözeltisi eklendi. Plağın üzeri kapatılarak plaka çalkalayıcıda bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi (400 rpm). Plak 350 µL yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandı ve kurutuldu. 100 µL reaksiyon çözeltisi (TMB Development Solution) eklenerek plaka çalkalayıcı üzerinde (400 rpm), karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µL reaksiyon durdurucu çözelti (Stop Solution) eklenerek bir dakika plaka çalkalayıcıda karıştırıldı (400 rpm). Plaka, optik okuyucuya (*SpectraMax Plus, Molecular Devices, US*) yerleştirilerek, Softmax Pro programında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Excel programında standart eğri grafiği çizilerek elde edilen formül ile BOS örneklerindeki YKL-40 konsantrasyonu hesaplandı.

- **İnsan IL-6 ELISA**

BOS örneklerindeki IL-6 konsantrasyonunun belirlenmesi için insan IL-6 ELISA kiti kullanıldı (*ab178013, Abcam*).

Örneklerin hazırlanması: BOS örnekleri -80°C'den çıkarılarak buz üzerinde çözülmeleri sağlandı. Örneklerde seyreltme yapılmadı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak tüm çözeltiler ve malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra çalışmaya başlandı. Kitte yer alan yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1:10 konsantrasyona seyreltildi. Liyofilize haldeki yakalama antikor numune seyreltici eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra pipet ile karıştırıldı. Yakalama antikor (Capture Antibody), detektör antikor (Detector Antibody) ve antikor seyreltici 5BI (Antibody Diluent 5BI) çözeltileri kit içeriğinde belirtilen

oranlarda eklenerek antikor kokteyl çözeltisi hazırlandı. Standartlar deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Kit içeriğindeki liyofilize halde bulunan IL-6 standartı numune seyreltici (Sample Diluent NS) ile 2000 pg/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok standart çözeltisinden 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, 15.6 pg/mL, 7.8 pg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.

Deney protokolü: Tüm standartlar ve örnekler iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 96 kuyulu plağın kuyulara standart ve örnekler 50 µL eklendi. Ardından 50 µL antikor kokteyl çözeltisi eklendi. Plağın üzeri kapatılarak plaka çalkalayıcıda bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi (400 rpm). Plak 350 µL yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandı ve kurutuldu. 100 µL reaksiyon çözeltisi (TMB Development Solution) eklenerek plaka çalkalayıcı üzerinde (400 rpm), karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µL reaksiyon durdurucu çözelti (Stop Solution) eklenerek bir dakika plaka çalkalayıcıda karıştırıldı (400 rpm). Plaka, optik okuyucuya (*SpectraMax Plus, Molecular Devices, US*) yerleştirilerek, Softmax Pro programında 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Excel programında standart eğri grafiği çizilerek elde edilen formül ile BOS örneklerindeki IL-6 konsantrasyonu hesaplandı.

3.4. VERİLERİN ANALİZİ

İstatistiksel analizlerde *SPSS versiyon 25.0* paket programı kullanılmış olup grafiklerin düzenlenmesinde *GraphPad Prism versiyon 9.0* programından faydalanılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik (cinsiyet, yaş, hastalık başlangıç yaşı), klinik ve laboratuvar (SMA sınıflandırması, maksimum motor kapasitesi ve *SMN2* kopya sayısı) özelliklerini belirlemede tanımlayıcı istatistik yöntemler kullanılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testleri kullanılarak belirlenmiştir. Kategorik

değişkenler sayı ve yüzde şeklinde, sürekli değişkenler ise ortanca (minimum - maksimum) ve/veya ortalama (\pm standart sapma, SD) şeklinde ifade edilmiştir.

Bağımlı gruplar arasındaki farkın analizinde, normal dağılıma uyan değişkenler için bağımlı örnekler t-testi; normal dağılıma uymayan değişkenler için Wilcoxon testi kullanılmıştır. Bağımsız gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede ise değişkenlerin normal dağılıma uygunluğuna göre bağımsız örnekler t-testi veya Mann Whitney U testi yapılmıştır. Değişkenler arası ilişkinin incelenmesinde Pearson (r) veya Spearman (rho) korelasyon testleri kullanılmıştır.

Farklı prediktörlerden tedavi sonrası klinik anlamlı yanıtı ön görebilecek bir model oluşturmak ve yanıt üzerinde bağımsız etkisi olan faktörleri belirlemek için lineer regresyon analizi kullanılmıştır. Lineer regresyon modeli Backward yöntemi ile oluşturulmuştur. Tek değişkenli (univariate) analizlerde belirlenen olası faktörler kullanılarak, kötü klinik sonlanımı öngörmeye etkili bağımsız prediktörler ve risk faktörleri Backward LR lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Biyobelirteçlerin hastalığı öngörmeye tanısız karar verdirici özellikleri ROC eğrisi analizi ile incelenmiştir. ROC analizlerinde, eğri altında kalan alan ("area under the curve", AUC) %95 güven aralığıyla (%95 CI) sunulmuştur. Anlamlı sınır değerlerin varlığında, bu sınırların sensitivite (duyarlılık) ve spesifite (özgüllük) değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HASTALARIN DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 01.03.2019-01.03.2023 tarihleri arasında SMA tanısı ile nusinersen tedavisi uygulanmış 18 yaş ve üzerinde toplam 24 hasta dahil edilmiştir (**Tablo 4.1**). Hastaların ortalama hastalık başlangıç yaşı 8,70 (\pm 6,18) yıl iken ortalama tedavi başlangıç yaşı 34,12 (\pm 10,04) yıldır. Çalışma grubunun %79,2 (n=19)'si erkeklerden oluşmaktadır.

Hastaların %87,5 (n=21)'i SMA tip 3 tanısı ile izlenmekte olup; diğer hastalar tip 2 tanılıdır. Tüm hastalarda SMA tanısı, *SMN1* geninde ekzon 7 ve/veya ekzon 8'de homozigot delesyonların gösterilmesi ile koyulmuştur. *SMN2* kopya sayıları sırasıyla şu şekildedir; 2 kopya (n=3, %12,5), 3 kopya (n=8, %50) ve 4 kopya (n=13, %37,5). Tedavi öncesi değerlendirmelerde hastaların %37,5'i (n= 9) ambulatuvar iken diğer hastaların ulaşabildikleri maksimum fonksiyonel kapasite "desteksiz oturma" şeklindedir.

Tablo 4.1. Hastaların Demografik Verileri ve Klinik Özellikleri

Özellik	Değer
Cinsiyet (n, %)	
	Kadın 5, %20,8
	Erkek 19, %79,2
Yaş (ortalama \pm SD)	34,12 \pm 10,04
Hastalık Başlangıç Yaşı (ortalama \pm SD)	8,70 \pm 6,18
SMA Sınıflandırması (n, %)	
	Tip 2 3, %12,5
	Tip 3 21, %87,5
Fonksiyonel Durum (n, %)	
	Desteksiz Oturma 15, %62,5
	Yürüme 9, %37,5
<i>SMN2</i> Kopya Sayısı (n, %)	
	2 Kopya 3, %12,5
	3 Kopya 8, %50
	4 Kopya 13, %37,5

Tüm hastalarda nusinersen tedavisi öncesi (T0) HFMSE (66 puan üzerinden), ALSFRS-R (48 puan üzerinden) ve MRC-SS (60 puan üzerinden) motor ölçekleri değerlendirilmiştir (**Tablo 4.2**). Hastaların tedavi öncesi HFMSE puan ortalaması $32,83 \pm 18,04$ iken ALSFRS-R puan ortalaması $36,62 \pm 5,12$ 'dir. Ek olarak, MRC-SS ortanca değeri 35,5 (28 – 54)'dir. Ambulatuvar hastaların (n=9) tedavi öncesi ortalama yürüme mesafesi 6DYT ölçeği kullanılarak hesaplanmıştır ve ortalama $346 \pm 172,9$ metredir.

Tablo 4.2. Hastaların Tedavi Öncesi Motor Ölçek Sonuçları

Motor Ölçek	Değer
HFMSE (n=24, maks. 66 puan)	
Ortalama \pm SD	$32,83 \pm 18,04$
ALSFRS-R (n=24, maks. 48 puan)	
Ortalama \pm SD	$36,62 \pm 5,12$
MRC-SS (n=24, maks. 60 puan)	
Ortanca (minimum – maksimum)	35,5 (28 – 54)
6DYT, metre (n=9)	
Ortalama \pm SD	$346 \pm 172,9$

4.2. KONTROL GRUBUNUN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmanın kontrol grubuna, 01.11.2021-01.03.2023 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi nöroloji polikliniğine baş ağrısı şikayetiyle başvuran ve kriterleri sağlayan 12 katılımcı dahil edilmiştir. Katılımcıların bilinen herhangi bir dahili hastalık tanısı ve herhangi bir nedenle düzenli ilaç kullanım öyküsü yoktur. BOS incelemesi sonrası bir yıllık izlem süresince katılımcılar herhangi bir nörolojik hastalık tanısı almamıştır. Kontrol grubunun ortalama yaşı $36,08 \pm 7,83$ yıldır ve %50 (n=12)'si erkeklerden oluşmaktadır. Çalışma ve kontrol grubu arasında demografik özellikler açısından bir farklılık saptanmamıştır (**Tablo 4.3**).

Tablo 4.3. Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Özellikleri

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	p değeri
Cinsiyet (n, %)			
Kadın	5, %20,8	6, %50	0,124 [§]
Erkek	19, %79,2	6, %50	
Yaş (ortalama ± SD)	34,12 ± 10,04	36,08 ± 7,83	0,559 ^π

§: Ki kare testi; π: Bağımsız örnekler t testi

4.3. HASTA VE KONTROL GRUBU KARŞILAŞTIRMALI ANALİZLER

4.3.1. Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması

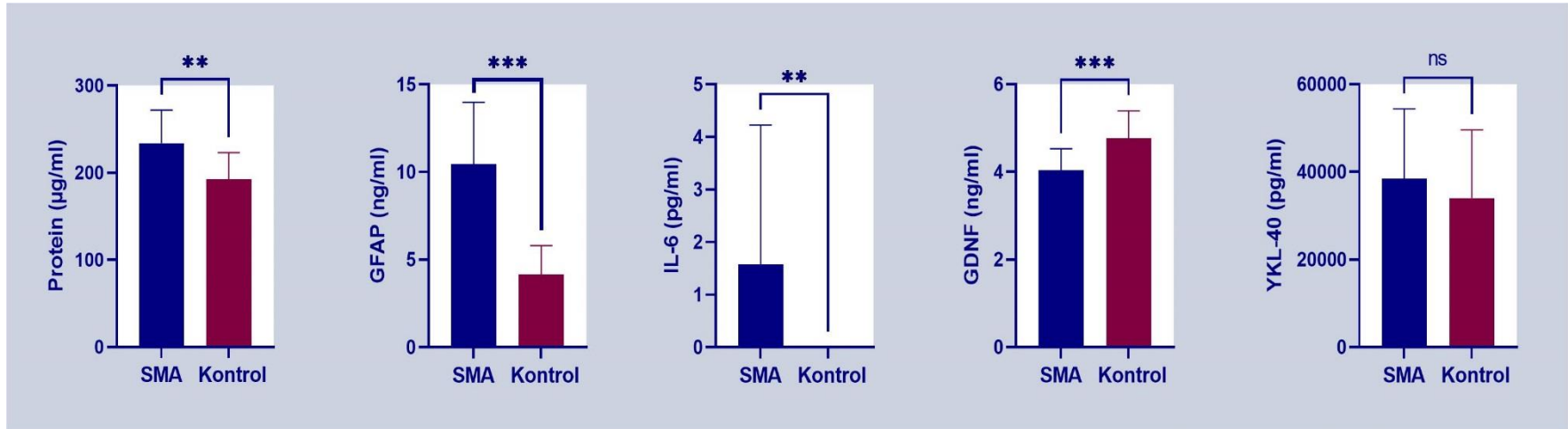
SMA hastalarının (T0, tedavi öncesi) ve kontrol grubunu BOS biyobelirteç düzeyleri karşılaştırılmıştır (**Tablo 4.4, Şekil 4.1**).

Tablo 4.4. Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi

	SMA Grubu Ortalama ± SD (n=24)	Kontrol Grubu Ortalama ± SD (n=12)	p
Protein (µg/ml)	233,89 ± 38,04	192,67 ± 30,50	0,002[¥]
GFAP (ng/ml)	10,43 ± 3,54	4,15 ± 1,64	<0,001^π
IL-6 (pg/ml)	1,57 ± 2,65	0 ± 0	0,026[¥]
GDNF (ng/ml)	4,03 ± 0,49	4,76 ± 0,62	<0,001[¥]
YKL-40 (pg/ml)	38465,91 ± 15931,08	34040,91 ± 15555,29	0,416 [¥]

*¥: Mann Whitney U testi
π: Bağımsız örnekler t-testi*

SMA hastalarının ortalama BOS protein konsantrasyonu, GFAP ve IL-6 seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0,05$). Ek olarak, SMA hastalarının BOS GDNF düzeyi kontrol grubuna kıyasla daha düşüktür ($p < 0,05$). Hastalar ve kontroller arasında BOS YKL-40 düzeyi açısından anlamlı farklılık izlenmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.1. SMA Hastalarının BOS Biyobelirteç Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırması

(Sütun grafikler ortalamayı (\pm SD) ifade etmektedir. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir.)

4.3.2. ROC Eğrisi Analizleri

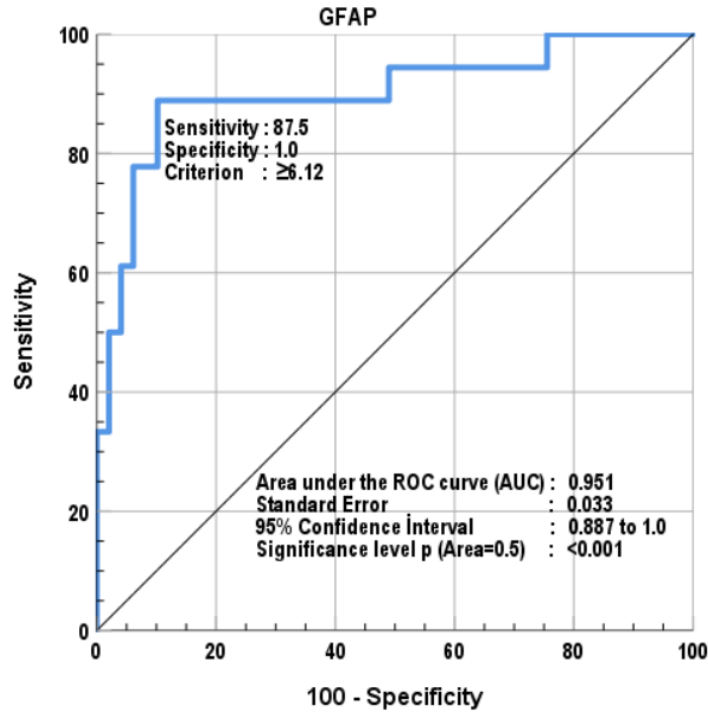
Biyobelirteçlerin hastalığı öngörmeye tanısıl karar verdirici özellikleri ROC eğrisi analizi ile incelenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. SMA Tanısını Öngörmeye Biyobelirteç Değerlerinin ROC Eğrisi Analizi

	AUC (%95 CI)	Sınır Değer (cut-off)	Duyarlılık (Sensitivite) %	Özgüllük (Spesifite) %	p değeri
GFAP (ng/ml)	0,951 (0,887 - 1,000)	$\geq 6,12$	87,5	100	<0,001
IL-6 (pg/ml)	0,729 (0,568 - 0,890)	-	-	-	0,027
GDNF (ng/ml)	0,861 (0,738 - 0,985)	$\leq 4,30$	79,2	83,3	<0,001
YKL-40 (pg/ml)	0,587 (0,391 - 0,783)	-	-	-	0,402

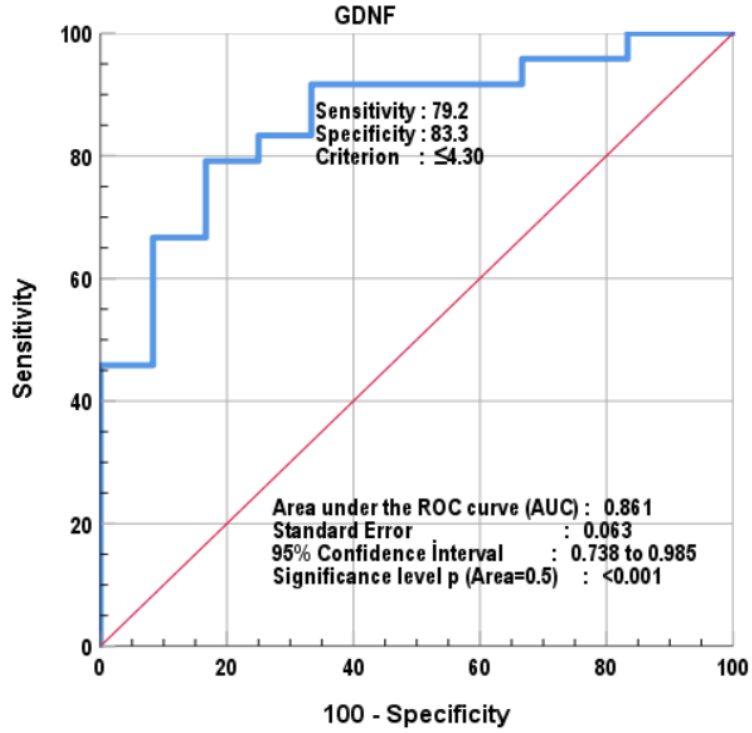
AUC: Eğri altında kalan alan, %95 CI: %95 güven aralığı

SMA hastalığı için tanısıl karar vermede, BOS GFAP değerlerinin (sınır $\geq 6,12$ ng/ml) %87,5 duyarlılık (sensitivite) ve %100,0 özgüllük (spesifite) düzeyinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. BOS GFAP Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi

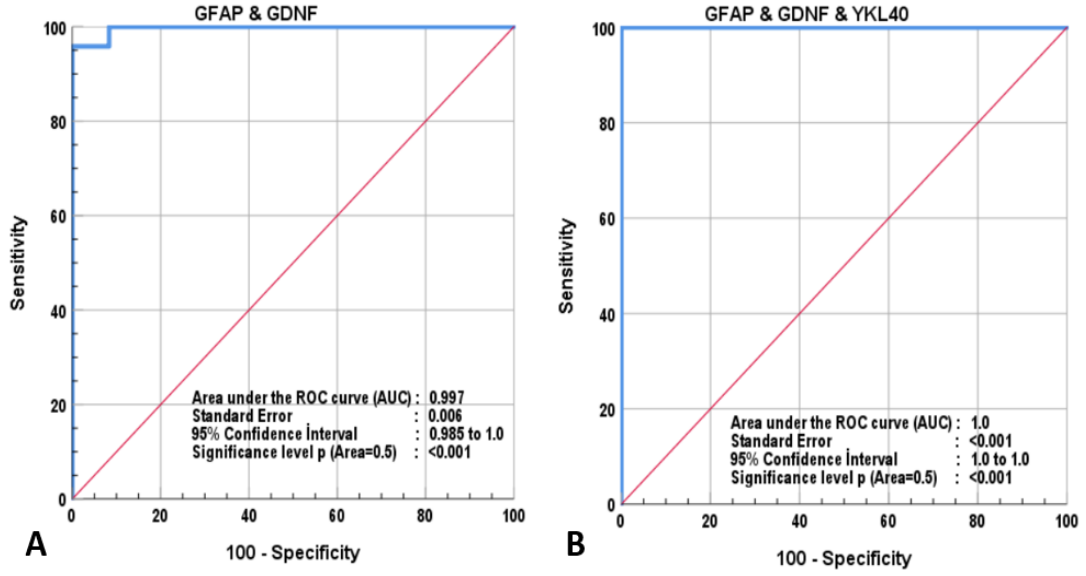
SMA hastalığı için tanısal karar vermede, BOS GDNF değerlerinin (sınır $\leq 4,30$ ng/ml) %79,2 duyarlılık (sensitivite) ve %83,3 özgüllük (spesifite) düzeyinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. BOS GDNF Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi

SMA hastalığı için tanısal karar vermede, BOS GFAP ve BOS GDNF biyomolekül değerleri birleştirilerek oluşturulan lojistik regresyon modeliyle hesaplanan öngörülen olasılık (predicted probability) değerlerinin %95,8 duyarlılık (sensitivite) ve %100,0 özgüllük (spesifite) düzeyinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca, eğri altında kalan alan (AUC) 0,997 (%95 Güven Aralığı: 0,985-1,0) olarak hesaplanmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 4.4).

Lojistik regresyon modeline YKL-40 molekülü dahil edildiğinde, duyarlılık (sensitivite) % 100,0, özgüllük (spesifite) %100,0 ve eğri altında kalan alan (AUC) 1,0 (%95 Güven Aralığı: 1,0-1,0) değerine ulaşmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. GFAP & GDNF (A) ve GFAP & GDNF & YKL-40 (B) Lojistik Regresyon Modeliyle Hesaplanan Öngörülen Olasılık (predicted probability) Değerlerinin SMA Tanısı İçin ROC Eğrisi Analizi

4.4. HASTA GRUBU ANALİZLERİ

4.4.1. Tedavi Altında Motor Fonksiyonel Ölçek Skorlarının Değişimi

Hastaların tedavi öncesi (T0) ve tedavi altında 15.ayda (T15) motor fonksiyonel ölçekleri değerlendirilmiştir (**Tablo 4.6** ve **Şekil 4.5**).

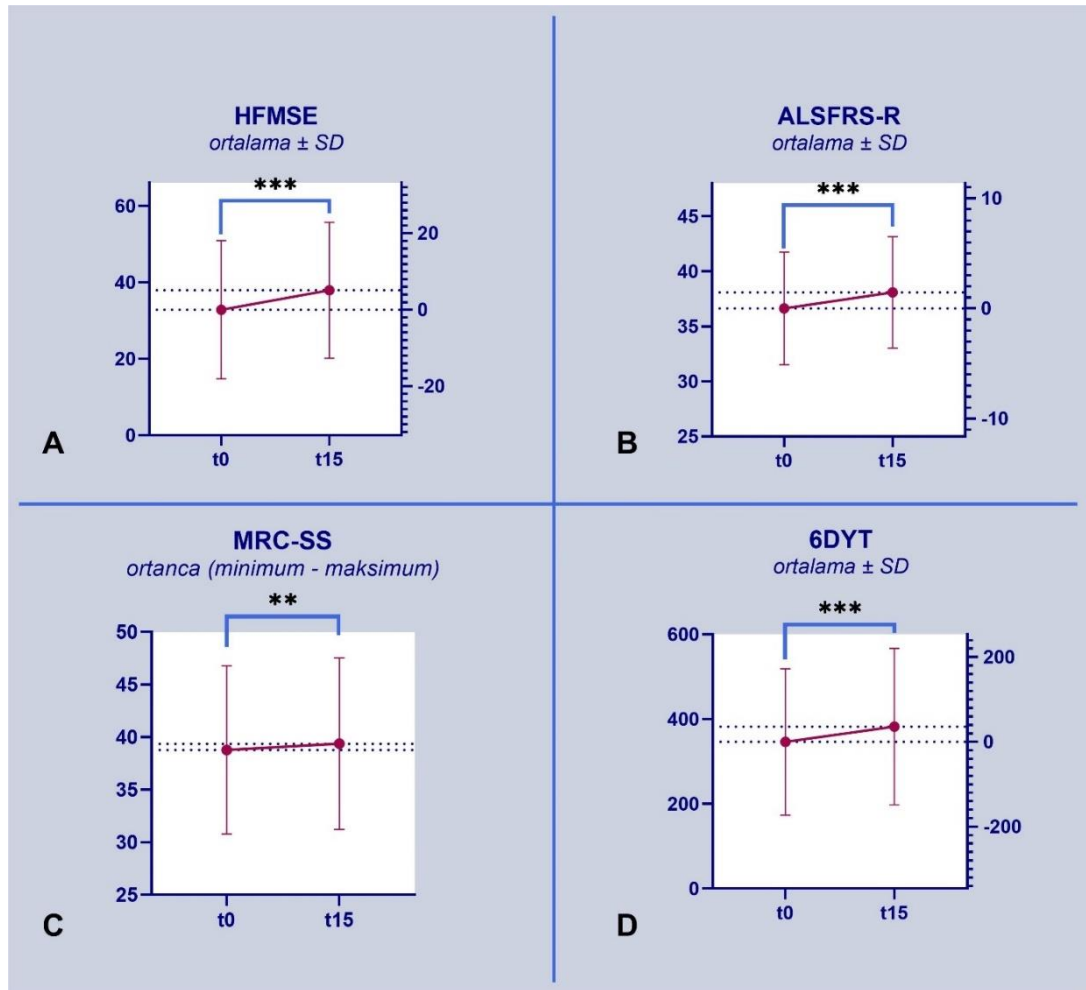
HFMSE ölçeğinde ortalama $5,08 \pm 3,10$ puan ($p < 0,001$) ve ALSFRS-R ölçeğinde ortalama $1,45 \pm 1,38$ puan ($p < 0,001$) artış izlenmiştir. MRC-SS değerlendirmesinde ise hastalarda maksimum 2 puanlık artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Ambulatuvar hastaların yürüme mesafesinde 6DYT'de ile ortalama $36,11 \pm 21,66$ metrelik iyileşme saptanmıştır ($p < 0,001$).

Tablo 4.6. Motor Ölçek Skorlarının Sonuçları

Motor Ölçekler	T0	T15	Skor Değişimi (T15-T0)	p değeri
HFMSE (n=24)				
Ortalama ± SD	32,83 ± 18,04	37,91 ± 17,77	5,08 ± 3,10	<0,001 ^a
ALSFRS-R (n=24)				
Ortalama ± SD	36,62 ± 5,12	38,05 ± 5,05	1,45 ± 1,38	<0,001 ^a
MRC-SS (n=24)				
Ortanca (min – maks)	35,5 (28 – 54)	37 (28 – 56)	0 (0 – 2)	0,002^β
6DYT (n= 9)				
Ortalama ± SD	346 ± 172,9	382,11 ± 184,42	36,11 ± 21,66	<0,001 ^a

α: Bağımlı örnekler t-testi
β: Paired Wilcoxon testi

**Şekil 4.5.** Motor Ölçek Skorlarının Değişimi

(*** $p \leq 0,001$ ve ** $p < 0,05$)

4.4.2. Biyobelirteç Düzeyleri ve Zamanla Değişimi

Biyobelirteç adaylarının (GFAP, GDNF, IL-6 ve YKL-40) BOS düzeyleri ve toplam BOS protein konsantrasyonu T0 ve T15 zaman noktalarında analiz edilmiştir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.6). İlgili moleküllerin iki zaman noktası arasında değişimi ve farkın istatistiksel anlamlılığı hesaplanmıştır. Nusinersen tedavisi altında BOS IL-6 düzeyi ortalama $1,48 \pm 2,56$ pg/ml azalmış olup; T0 seviyelerine göre ortalama $\%95,72 \pm 13,08$ değişim göstermiştir ($p < 0,001$). Benzer şekilde BOS YKL-40 düzeyi ortalama 6539 ± 10042 pg/ml azalmış ve başlangıca göre ortalama $\%14,36 \pm 18,99$ değişim göstermiştir ($p < 0,001$). Buna karşın, BOS GDNF düzeyi T15 analizlerde ortalama $0,28 \pm 0,52$ ng/mL artmış ve başlangıç değerlerine kıyasla ortalama $\%7,93 \pm 12,08$ değişim göstermiştir ($p < 0,05$). BOS toplam protein konsantrasyonu ve GFAP düzeyi tedavi altında başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir.

Tablo 4.7. Başlangıç BOS Biyobelirteç Düzeyleri ve Tedavi Altındaki Değişimleri

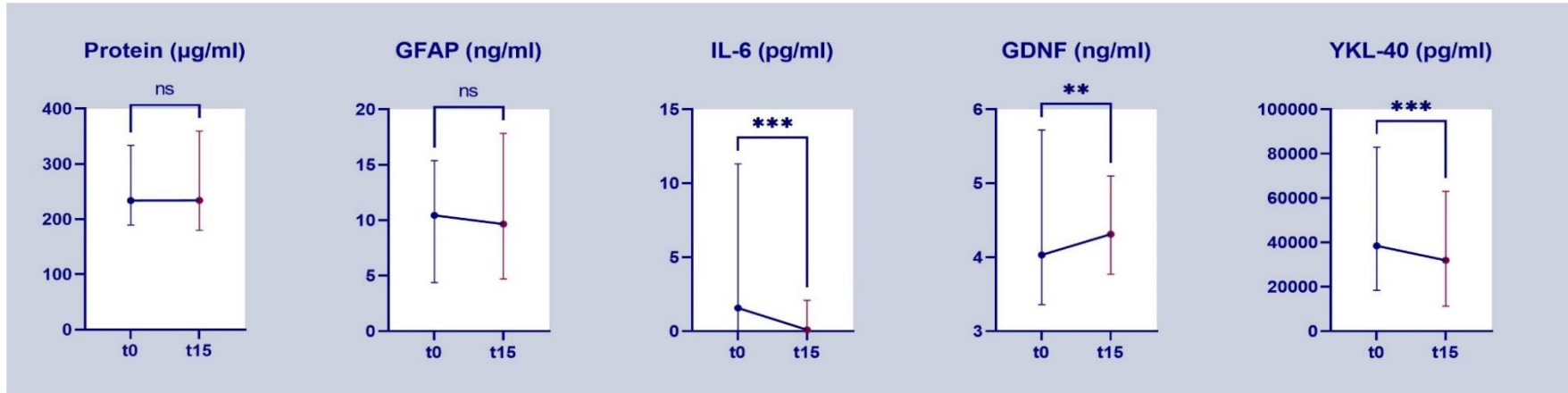
	T0 (ortalama \pm SD)	T15 (ortalama \pm SD)	Mutlak Değişim* T0-T15 (ortalama \pm SD)	Mutlak Değişim Yüzdesi** (ortalama \pm SD)	p değeri
Protein (μg/ml)	233,89 \pm 38,04	234,26 \pm 42,49	0,36 \pm 49,31	1,73 \pm 19,63	0,898 ^β
GFAP (ng/ml)	10,43 \pm 3,54	9,66 \pm 3,97	0,77 \pm 2,87	6,10 \pm 24,31	0,199 ^α
IL-6 (pg/ml)	1,57 \pm 2,65	0,09 \pm 0,42	1,48 \pm 2,56	95,72 \pm 13,08	<0,001^β
GDNF (ng/ml)	4,03 \pm 0,49	4,31 \pm 0,37	0,28 \pm 0,52	7,93 \pm 12,08	0,004^β
YKL-40 (pg/ml)	38465 \pm 15931	31926 \pm 11907	6539 \pm 10042	14,36 \pm 18,99	<0,001^β

α: Bağımlı örnekler t-testi
β: Paired Wilcoxon testi

*İki zaman noktası arasındaki skor değişimi hesaplanırken pozitif ortalama elde edebilmek adına; daha yüksek olan zaman noktasındaki ölçümden çıkarma işlemi uygulanmıştır.

**Moleküllerin başlangıç değerine göre mutlak değişim yüzdesi hesaplanmıştır. Bu amaçla kullanılan formül şu şekildedir;

$$\text{Mutlak Değişim Yüzdesi} = \frac{|T0-T15|}{T0} \times 100$$



Şekil 4.6. Moleküllerin BOS Düzeyinin Tedaviyle Değişimi

*Zaman noktalarındaki değerler ortalama (minimum – maksimum) parametreleri ile sunulmuştur.
(ns: istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,05$)*

4.4.3 Korelasyon Analizleri

Hastaların klinik özellikleri ile moleküllerin BOS konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizleri yapılmıştır (**Tablo 4.8**).

Hastaların tedavi başlangıç yaşları hem BOS GFAP hem de BOS YKL-40 konsantrasyonu ile pozitif yönde orta dereceli korelasyon göstermiştir (*sırasıyla* $r=0,558$ ve $r=0,429$, $p<0,05$). Benzer şekilde, hastaların SMN2 kopya sayıları, BOS GFAP ve YKL-40 düzeyi ile pozitif yönde orta dereceli korelasyon göstermiştir (*sırasıyla* $r=0,429$ ve $r=0,451$, $p<0,05$). Hastaların tedavi öncesi motor ölçek skorları ile moleküllerin tedavi öncesi BOS seviyeleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.8. Klinik Verilerinin Biyomolekül Seviyeleri ile Korelasyonu

	Protein ($\mu\text{g/ml}$)		GFAP (ng/ml)		IL-6 (pg/ml)		GDNF (ng/ml)		YKL40 (ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Tedavi Başlangıç Yaşı	0,232	0,275	0,558	0,005**	0,024	0,911	0,074	0,731	0,576	0,003**
Hastalık Başlangıç Yaşı	0,049	0,822	-0,024	0,910	0,168	0,434	-0,112	0,604	0,14	0,513
SMN2 Kopya Sayısı	-0,157	0,463	0,429	0,036**	-0,158	0,46	0,079	0,713	0,451	0,027**
HFMSE	-0,048	0,823	-0,213	0,317	0,172	0,421	-0,209	0,327	0,169	0,429
ALSFRS-R	0,01	0,961	-0,209	0,328	0,163	0,447	-0,201	0,347	0,144	0,503
MRC-SS	0,065	0,763	-0,185	0,386	0,217	0,309	-0,245	0,248	0,195	0,361
6DYT	0,133	0,732	-0,081	0,836	-0,593	0,092	0,167	0,668	0,217	0,576

Verilerin dağılımına göre Pearson R veya Spearman Rho korelasyon testleri kullanılmıştır.

Korelasyon katsayısı 'r' ile ifade edilmiştir.

İstatiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar koyu renkle belirtilmiştir.

*** $p<0,05$*

Tedavi altında 15.ayda (T15) değerlendirilen motor ölçek puanlarının biyomolekül düzeylerinin iki zaman noktası arasında mutlak değişimi ($|T15-T0|$) ile olan korelasyonu incelenmiştir (**Tablo 4.9**).

Tablo 4.9. Tedavi Altında Değerlendirilen Motor Ölçek Puanlarının Biyomolekül Düzeylerindeki Değişim ile Korelasyonu

	Protein T15-T0 ($\mu\text{g/ml}$)		GFAP T15-T0 (ng/ml)		IL-6 T15-T0 (pg/ml)		GDNF T15-T0 (ng/ml)		YKL40 T15-T0 (ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
HFMSE (T15)	-0,068	0,753	-0,437	0,033**	0,125	0,562	0,168	0,432	-0,234	0,272
ALSFRS-R (T15)	0,015	0,945	-0,367	0,078	0,094	0,661	0,049	0,822	-0,255	0,229
MRC-SS (T15)	-0,043	0,843	-0,275	0,194	0,201	0,347	0,092	0,668	-0,292	0,167
6DYT (T15)	-0,510	0,160	-0,711	0,032**	-0,443	0,233	-0,410	0,273	-0,025	0,949

*Verilerin dağılımına göre Pearson R veya Spearman Rho korelasyon testleri kullanılmıştır.
Korelasyon katsayısı 'r' ile ifade edilmiştir.
İstatiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar koyu renkle belirtilmiştir. ** $p < 0,05$*

Tedavi sonrası ölçülen 6DYT mesafesi BOS GFAP düzeyindeki değişim ile negatif yönde güçlü korelasyon gösterirken; tedavi sonrası HFMSE skorları da BOS GFAP düzeyindeki değişim ile negatif yönlü orta dereceli bir korelasyon sergilemiştir (sırasıyla $r = -0,711$ ve $r = -0,437$, $p < 0,05$).

İki zaman noktası arasında moleküllerin düzeyindeki değişim ile motor ölçek skorlarındaki değişimin korelasyonu incelenmiştir (Tablo 4.10). Sadece protein konsantrasyonundaki değişim ile 6DYT mesafesi arasında negatif yönlü güçlü korelasyon saptanmıştır ($r = -0,787$, $p < 0,05$).

Tablo 4.10. Zaman Noktaları Arasında Biyomoleküllerin Düzeyindeki Değişim ile Motor Ölçek Puanlarındaki Değişimin Korelasyonu

	Protein T15-T0 ($\mu\text{g/ml}$)		GFAP T15-T0 (ng/ml)		IL-6 T15-T0 (pg/ml)		GDNF T15-T0 (ng/ml)		YKL40 T15-T0 (ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
HFMSE (T15-T0)	0,24	0,258	0,375	0,071	0,196	0,36	0,19	0,374	-0,004	0,987
ALSFRS-R (T15-T0)	0,014	0,947	0,301	0,153	-0,031	0,884	0,205	0,336	0,162	0,449
MRC-SS (T15-T0)	0,227	0,287	-0,013	0,953	0,052	0,808	0,21	0,324	-0,145	0,499
6DYT (T15-T0)	-0,787	0,012**	-0,385	0,306	0,094	0,811	-0,1	0,797	0,192	0,62

*Verilerin dağılımına göre Pearson R veya Spearman Rho korelasyon testleri kullanılmıştır.
Korelasyon katsayısı 'r' ile ifade edilmiştir.
İstatiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar koyu renkle belirtilmiştir. ** $p < 0,05$*

4.4.4. Klinik Anlamli Yanit Skoru

Yükleme dozları sonrası hastadaki tedavi yanıtını değerlendirmek adına; hastaların ölçek puanları üzerinden yeni bir skorlama (*linik anlamli yanıt skoru*) yapılmıştır. Literatürde, erişkin tüm SMA hastaları için HFMSE skorunda 3 puanlık artış veya ambulatuvar hastalarda 6DYT’de 30 metrelik mesafe artışı “linik anlamli yanıt” olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla, ambulatuvar hastalarda 30 metrelik her mesafe artışı 1 birim kabul edilerek her bir ambulatuvar hastanın (n= 9) klinik anlamli yanıt skoru hesaplanmıştır. Örneğin, tedavi sonrası 45 metre mesafe artışı olan hastanın klinik anlamli yanıt skoru 1,5 birim olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, ambulatuvar olmayan hastalarda tedavi sonrası HFMSE skorunda meydana gelen her 3 puanlık artış için klinik anlamli yanıt skoru 1 birim kabul edilerek her non-ambulatuvar hasta (n= 15) için klinik anlamli yanıt skoru hesaplanmıştır. Örneğin, tedavi sonrası HFMSE skorunda 11 puanlık artışı olan hastanın klinik anlamli yanıt skoru 3,66 birim olarak hesaplanmıştır. Bu kohortta “ortalama klinik anlamli yanıt skoru” $1,53 \pm 0,88$ ’dir.

Tedavi Yanıtını Öngörebilecek Faktörlerin Analizi:

Farklı prediktörlerden tedavi sonrası klinik anlamli yanıt skorunu öngörebilecek bir model oluşturmak ve yanıt üzerinde bağımsız etkisi olan faktörleri belirlemek için lineer regresyon analizi kullanılmıştır. Modele hastalık ilişkili parametrelerden; *SMN2* kopya sayısı ve tedavi başlangıç yaşı dahil edilmiştir. Ek olarak, kontrol grubuna kıyasla tanısal değeri olan iki biyobelirtecin (GFAP ve GDNF) tedavi öncesi (T0) BOS düzeyi dahil edilmiştir. Lineer regresyon modeli Backward yöntemi ile oluşturulmuş ve klinik anlamli yanıt skorunu öngörececek en uygun model belirlenmiştir (**Tablo 4.11, Şekil 4.7**).

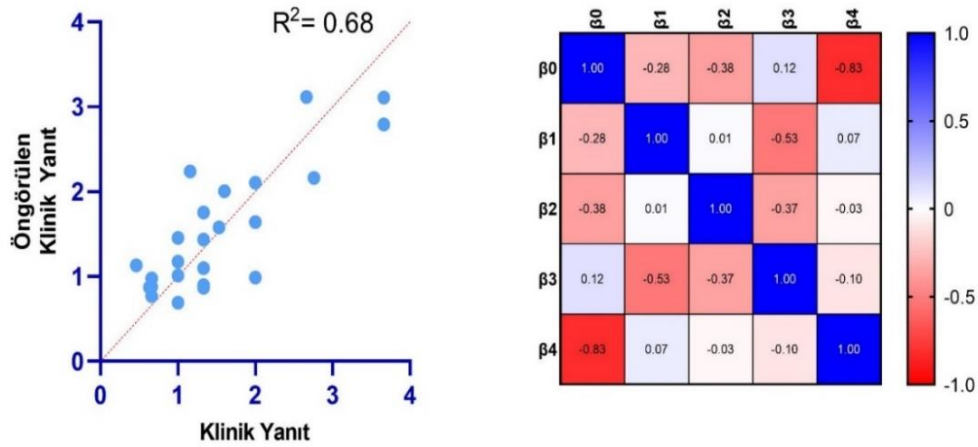
“Klinik anlamli yanıt skoru” üzerine tedavi başlangıç yaşı, başlangıç BOS GFAP ve GDNF seviyelerinin anlamli bir etkisi söz konusudur ($p<0,05$). *SMN2* kopya sayısı doğrudan klinik anlamli yanıt skoru için yordayıcı değildir. Tedavi başlangıç yaşında bir birimlik artış meydana geldiğinde; hastanın alacak olduğu klinik anlamli yanıt skorunda 0,073’lük bir azalma olacaktır ($p<0,001$). Tedavi öncesi BOS GFAP ve GDNF düzeylerinde 1 birimlik artış meydana geldiğinde ise hastanın alacak olduğu klinik anlamli yanıt skorunda sırasıyla 0,136 ve 0,512’lik bir artış olacaktır. Sonuç

olarak, hastaların tedavi sonrası ulaşabilecekleri “klinik anlamlı yanıt skoru”; iki klinik (*tedavi başlangıç yaşı ve SMN2 kopya sayısı*) parametre ve tedavi öncesi analiz edilen iki molekül düzeyi (*GFAP ve GDNF*) ile %68,4 oranda tahmin edilebilmiştir ($p < 0,001$, $R^2 = 0,684$, $Adj. R^2 = 0,617$).

Tablo 4.11. Klinik Anlamlı Yanıt Skorunu Öngörebilecek Model

Prediktörler	B (%95 CI)	beta	t	p değeri	Zero order	Partial
Tedavi Başlangıç Yaşı	-0,073 (-0,102 – -0,044)	0,825	-5,293	<0,001	-0,467	-0,772
SMN2 Kopya Sayısı	0,311 (-0,06 – 0,68)	0,251	1,754	0,095	0,316	0,373
GFAP (ng/ml) T0	0,136 (0,047 – 0,224)	0,540	3,207	0,005	0,217	0,593
GDNF (ng/ml) T0	0,512 (0,022 – 1,002)	0,285	2,188	0,041	0,360	0,449

*B: Standartlaştırılmamış katsayı, beta: Standartlaştırılmış katsayı, %95 CI: %95 güven aralığı
F= 10,279, p<0,001, R²=0,684, Adj. R²= 0,617, SE= 0,55*



Şekil 4.7. Regresyon Modelinin Gücü ve Dahil Edilen Parametrelerin Kovaryansı

(β_0 : intercept, β_1 : Yaş, β_2 : SMN2 kopya sayısı, β_3 : GFAP düzeyi, β_4 : GDNF düzeyi)

Kötü Klinik Sonlanım ile İlişkili Bağımsız Prediktörler ve Risk Faktörleri:

Kohort için hesaplanan “klinik anlamlı yanıt skoru” ortalama değerinin ($1,53 \pm 0,88$) altında tedavi yanıtı izlenen hastalar kötü klinik sonlanım ile

ilişkilendirilmiştir. Tek değişkenli analizlerde belirlenen olası faktörler kullanılarak bu durumu öngörmede etkili bağımsız prediktörler ve risk faktörleri Backward LR lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir (**Tablo 4.12**).

Tedavi sonrası daha kötü klinik sonlanımda rol oynayan risk faktörleri modellemesinin öngörme gücü %83,3'dür ($p<0,05$). Modele göre tedavi başlangıç yaşı arttıkça kötü klinik sonlanım riski 1,29 kat artmaktadır ($OR= 1,293$, %95 $CI= 1,050 - 1,591$, $p<0,05$). Buna karşın, tedavi öncesi BOS GFAP düzeyi arttıkça kötü klinik sonlanım riski azalmaktadır ($OR= 0,624$, %95 $CI= 0,395 - 0,985$, $p<0,05$); bu durum GFAP yüksekliğinin koruyucu özelliğini göstermektedir.

Tablo 4.12. Kötü Klinik Sonlanım ile İlişkili Bağımsız Risk Faktörleri

Risk Faktörleri	OR (%95 CI)	p değeri
Tedavi Başlangıç Yaşı	1,293 (1,050 – 1,591)	0,015
GFAP, T0, ng/ml	0,624 (0,395 – 0,985)	0,043

*OR: Odds ratio, %95 CI: %95 güven aralığı
Cox & Snell R Square= 0,393; Nagelkerke R Square=0,535
Accuracy= 0,833; p=0,003*

5. TARTIŞMA

Spinal musküler atrofi, *SMN1* genindeki homozigot mutasyonlar sonucu ortaya çıkan SMN protein eksikliğin yol açtığı alt motor nöron hastalığıdır [7]. SMN protein eksikliğinin SMA hastalığında görülen motor nöron dejenerasyonunun nedeni olduğu uzun yıllardır savunulmaktadır [7]. Ancak SMA hayvan modelleri göstermiştir ki, motor nöronlardaki SMN proteininin seçici olarak tükenmesi, çok hafif ve geç başlangıçlı bir SMA benzeri fenotipe yol açmaktadır [171]. Günümüzde, SMA patofizyolojisinin daha karmaşık olduğu ve yalnızca motor nöron dejenerasyonu ile açıklanamayacağı bilinmektedir [153, 171]. Özellikle astrositler gibi nöronal olmayan hücrelerin de nörodejeneratif sürece katkı sağladığı düşünülmektedir [172, 173].

Astrositler, nöronal homeostaz, nöronların trofik açıdan desteklenmesi ve sinaptik plastisite için önemlidir [173, 174]. Bu nedenle, astrositlerin süreçteki rolü, ALS gibi diğer motor nöron hastalıklarının patofizyolojisinde de araştırılmaya devam etmektedir [172, 173]. Glial hücrelerin sürece katkı sağladığı teorisi, SMA'lı hastaların spinal kord ön boynuzunda reaktif astrogliazis gösterilmesi ile desteklenmiştir [175-177]. Ek olarak, astrositlerde SMN protein seviyelerinin tekrar yükselmesi, artmış yaşam süresi ve iyileşmiş motor nöron fonksiyonu ile ilişkilendirilmiş [178] ve SMN protein eksikliğinin de astrogliazisi indüklediği gösterilmiştir [175]. Gittikçe önem kazanan SMA patogenezinde çoklu sistem tutulumu hipotezi, farklı tedavi seçeneklerinin ve yeni fenotiplerin ortaya çıkması ile daha da önem kazanmıştır.

Glial faktörlerin yanı sıra nöroinflamasyonun da nörodejeneratif hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine katkı sağladığı düşünülmektedir [153]. ALS'de inflamatuvar sitokinlerin sürece katkısını gösteren birçok çalışma mevcuttur [164-170]. En yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biri olmasına rağmen, SMA'daki olası nöroinflamatuvar bileşenler hakkında henüz yeterli ve tutarlı çalışma yoktur. Grubumuz tarafından tamamlanan bir çalışmada, inflamasyon ile ilişkilendirilen dolaşımdaki serbest mitokondriyal DNA'nın kontrol grubuna göre iki kat arttığı gösterilmiştir [179]. Bu bulgu SMA'da nörodejenerasyonun sistemik inflamasyona neden olduğunu ortaya koymuştur [179].

SMA patofizyolojisine ilişkin anlayışımızı ilerletmek ve hastalığın erken teşhisi ve tedavisi için daha iyi stratejiler geliştirebilmek için doğrulanmış biyobelirteçlere ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu çalışmada, SMA patogenezine katkı sağladığı düşünülen glial hücre aracılı yolda (GFAP ve GDNF) ve nöroinflamasyon sürecinde (IL-6 ve YKL-40) rol oynayan moleküller hem tanısal hem de tedavi yanıtını değerlendirme yetenekleri açısından BOS örneklerinde incelenmiştir.

5.1. TOPLAM BOS PROTEİN KONSANTRASYONU TAYİNİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Intratekal nusinersen tedavisinin uygulanmaya başlamasıyla, biyobelirteç çalışmalarının yanı sıra BOS protein konsantrasyonunu değerlendiren çalışmalar da peş peşe yayımlanmıştır [138, 180, 181]. Çalışmalarda, sağlıklı kontrollere kıyasla SMA'lı hastaların toplam BOS protein konsantrasyonunun belirgin farklılık göstermediği vurgulanmıştır [138, 180, 181]. Farklı olarak, kohortumuzdaki SMA'lı hastaların toplam BOS protein konsantrasyonu, kontrollere kıyasla istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Bu durum, önceki çalışmalarda bildirildiği gibi [180], kohorttaki hastalarda yaygın olarak bulunan, spinal stenoz veya skolyozla ilişkili BOS akım işlev bozukluklarına bağlı olabilir ve kohortun uzun süre tedavi almamış erişkin SMA hastalarını içermesiyle açıklanabilir.

Nusinersen tedavisi altında toplam BOS protein konsantrasyonunda hafif bir artış önceki çalışmalarda bildirilmiştir [138, 180, 181]. Tedavi süresince BOS toplam protein seviyelerindeki değişiklikler kohortumuzda da önceki çalışmalarla benzer olup; tedavi altında BOS protein seviyesinde hafif bir artıştan söz etmek mümkündür. Ancak, protein seviyesindeki değişiklikler motor fonksiyon skorundaki (HFMSE) değişikliklerle korelasyon göstermemiştir [138]. Araştırmacılar, toplam protein değerlerindeki hafif değişikliklerin, tekrarlayıcı intratekal uygulama ve lomber ponksiyon girişimlerinden kaynaklandığını öne sürmektedir [180]. Ayrıca, BOS'taki toplam protein seviyesi yaşla değişiklik gösterebildiği için [182] tedavi takibi için uygun bir aday değildir.

5.2. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK GLİAL FİBRİLLARY ACİDİK PROTEİN (GFAP)

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), olgun astrositlerde bulunan bir ara filamenttir ve hücre iskeletinin temel unsuru olarak kabul edilir [183]. GFAP ekspresyonunda artış, beyin hasarı ve yaşlanma ile doğrudan ilişkilendirilen reaktif gliozisin bir göstergesi kabul edilmektedir [184]. Doku, serum veya BOS'ta artan GFAP konsantrasyonları, çeşitli nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve prediktif değere sahip olduğu bildirilmiştir [185-190]. Astrogliazis, SMA farelerinin (SMN Δ 7) omurilik ön boynuz gri maddesinde de gösterilmiştir [175-177]. Ek olarak, astrositlerde reaktif olarak GFAP ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir [175, 191].

Olsson ve ark. SMA tip 1 tanılı çocuklarda kontrollere kıyasla BOS GFAP seviyelerinde artış bildirmiş ve GFAP seviyeleri nusinersen altında azalmıştır [155]. BOS GFAP konsantrasyonunun kontrollere kıyasla önemli ölçüde farklılık göstermediği başka bir çalışmada [142] ise araştırma ekibi bu durumu kohorttaki hastaların daha düşük hastalık aktivitesine sahip olması ile açıklamış ve GFAP konsantrasyonu ile hastalık şiddeti arasında korelasyon olduğunu vurgulamıştır. Bu nedenle, iki çalışmanın karşılaştırılabilirliği sınırlıdır ve çalışmalar SMA patogenezinde astrositlerin rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. SMA ile ortak patogenezin hizmet ettiği ALS hastalarında da diğer nörolojik hastalıklara kıyasla BOS GFAP seviyesinde artıştan söz etmek mümkündür ve bu artış semptomların süresi ile ilişkilendirilmiştir [189]. Kohortumuzda, tedavi almamış SMA hastalarının ortalama BOS GFAP seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek saptanmış olup; SMA'da astrogliazisin varlığını gösteren çalışmaları desteklemektedir. ROC eğrisi analizlerinde ise GFAP molekülünün SMA hastalığı için tanısal karar verdiriciliği, sınır $\geq 6,12$ ng/ml alındığında, %87,5 duyarlılık (sensitivite) ve %100,0 özgüllük (spesifite) düzeyinde saptanmıştır. Ek olarak, tedavi başlangıç yaşı ve SMN2 kopya sayısı, başlangıç BOS GFAP konsantrasyonu ile orta derecede korelasyon göstermiştir. Bulgular, GFAP ekspresyonunun motor nöron fonksiyonunu pozitif yönde desteklediğini öne süren çalışmalarla tutarlıdır. Tedavi altında hastalarda GFAP düzeyi ortalama $0,77 \pm 2,87$ ng/ml'lik hafif bir azalma gösterse de bu durum istatistiksel anlamlı fark yaratmamış ve motor fonksiyonel değişimlerle doğrudan bir

ilişki göstermemiştir. Ancak, ileri analizlerde başlangıçtaki GFAP yüksekliğinin dolaylı olarak iyi klinik sonuç ile ilişkili olduğu ve koruyucu özelliği gösterilmiştir.

Yapılan sınırlı sayıda çalışma ve kohortumuzdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; motor nöron dejenerasyonunun yanı sıra astrogliozisin SMA sürecine dahil olduğu söylenebilir. Hasara yanıt olarak astrositlerin GFAP ekspresyonunu tetiklemesi, GFAP konsantrasyonlarının SMA'lı hastaların BOS örneklerinde yüksek saptanmasına yol açabilir. Nusinersen tedavisi ile astrositler gibi nöronal olmayan dokularda ve hücrelerde de SMN protein seviyeleri artabileceğinden, nusinersen tedavisine yanıt olarak GFAP seviyelerinde hafif bir azalma mümkün görünmektedir. Tedavi öncesi yüksek GFAP seviyeleri daha iyi tedavi yanıtı ile ilişkilendirilebilir. Mevcut bulgularla BOS GFAP molekülü erişkin SMA hastaları için hem tanıda hem de tedavi yanıtını ön görebilmek için uygun bir araç olarak görünmektedir. Ayrıca, glial aktivasyonun SMA patolojisinde yer aldığı ve bu aktivasyonun nusinersen tedavisi ile modüle edilebileceği hipotezi [155], kohortumuzdan elde edilen verilerle desteklenmiştir.

5.3. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK GLİAL CELL-DERİVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF)

Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nigrostriatal yoldaki dopaminerjik nöronların sağ kalımı için gerekli bir glial faktör olarak tanınmakta ve motor nöron sağ kalımını desteklediği bilinmektedir [192]. Birçok in vitro deney GDNF'nin motor nöronları dejenerasyondan koruduğunu göstermiştir [193-195]. Ek olarak, in vivo çalışmalarda GDNF'nin programlanmış hücre ölümü ve atrofi sürecini önlediği ve erken dönemde motor nöron hastalarının BOS ve kas örneklerinde arttığı gösterilmiştir [196-199]. Hayvan modelleri üzerine yapılan bazı çalışmalar GDNF'nin motor nöron gövde sayısında artışı tetiklediği ve nöromusküler bağlantıları kolaylaştırdığı hipotezlerini de ortaya atmıştır [200, 201].

GDNF'nin SMA için biyobelirteç olarak kullanımı ve molekülün prognostik değeri bu konuda yapılan çalışmaların yetersizliği nedeniyle henüz bilinmemektedir. ALS hastalarında yapılan çalışmalardan GDNF mRNA'sının erken dönemde denervasyona uğramış kaslarda arttığı, ancak hastalığın ileri evrelerinde düşme eğilimi gösterdiği bilinmektedir [202, 203]. SMA hastalarında yapılan tek çalışma da SMA tip

1 tanılı infantlarda BOS GDNF seviyesinde kontrollere kıyasla artış gösterilmiştir [156]. Bu çalışma, SMA tip 1 hastalarında GDNF'nin nöroprotektif mekanizmalarda anahtar role sahip olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kohortumuzda, tedavi almamış SMA hastalarının ortalama BOS GDNF seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Erişkin SMA hastalarında BOS GDNF düzeylerinin araştıran başka bir çalışmaya ulaşamamıştır. Ancak, ALS çalışmalarında hastalığın ileri evrelerinde GDNF ekspresyonunda azalma bildirilmiştir [202, 203]. Benzer şekilde, erişkin SMA hastalarında gözlenen GDNF düzeyindeki azalmanın denervasyona bağlı kas lifi sayısındaki azalma ve ilişkili kas distrofisi ile açıklanabileceği düşünülmektedir [202, 203]. Tip 1 SMA tanılı infantlarda GDNF'nin motor nöron dejenerasyonuna bağlı hücre içi inflamatuvar yanıtı karşı erken dönemde meydana gelen endojen koruma nedeniyle arttığı öne sürülmektedir [156].

ROC eğrisi analizlerinde ise GDNF molekülünün erişkin SMA hastalığı için tanısal karar verdiriciliği sınır $\leq 4,30$ ng/ml alındığında %79,2 duyarlılık (sensitivite) ve %83,3 özgüllük (spesifite) düzeyinde saptanmıştır. Kohortumuzda SMA hastalarının BOS örneklerinde arttığı gösterilen bir diğer protein olan GFAP ile ortak değerlendirildiklerinde ise erişkin SMA tanısı için öngörülen olasılık (predicted probability) %95,8 duyarlılık (sensitivite) ve %100,0 özgüllük (spesifite) düzeyine çıkmıştır.

Çalışma kohortumuzdaki SMA hastalarının BOS GDNF düzeylerinin kontrole göre azaldığı gözlenmiştir. BOS GDNF düzeylerini araştıran yeterli çalışma olmamakla birlikte, infantlarda yapılmış bir çalışmada [156] BOS GDNF düzeylerinin kontrollere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Söz konusu iki kohort arasındaki fark, hastalık süresi ve yaş ile ilişkili olabilir. Bunu destekler bir bulgu olarak kohortumuzda nusinersen tedavisi sonrası BOS GDNF düzeylerinde anlamlı artış izlenmiştir. Bu da GDNF'nin hastalık patogeneğinde aktif rol oynadığını ve tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, erişkin hastalarda azalan GDNF seviyeleri hasarın değerlendirilmesine katkı sağlarken, tedavi altında artan seviyeleri tedavi yanıtını değerlendirmede kullanılabilir. Bu bakış açısından değerlendirildiğinde, GDNF molekülü SMA patogeneğinde biyolojik olarak aktif rol oynar.

5.4. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK İNTERLÖKİN 6 (IL-6)

Anti-inflamatuvar tedavi stratejileri ALS dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda araştırılmakta ve immün aktivasyonun patogenezdaki rolünü vurgulayan çalışmalar peş peşe gelmektedir [164-170]. Ancak, immün sistemin ve nöroinflamatuvar sürecin SMA patogeneze katkısı ve terapötik bir hedef olarak potansiyel önemi henüz bilinmemektedir. SMA patogeneze inflamatuvar sürecin katkısını değerlendiren birkaç çalışma, yardımcı T hücre 1 ve 17 (Th1 ve Th17) aracılı sitokinlerin aktif rol oynadığını göstermiş ve tedavi ile bu sürecin modüle edilebildiğini ortaya koymuştur [160, 204]. Araştırılan moleküllerden IL-6 hem proinflamatuvar etkinlik gösteren hem de Th1/Th17 gelişiminde ve sürdürülmesinde rol alan bir sitokindir [205, 206]. Serum IL-6 düzeylerinin SMA hastalarında arttığını ve nusinersen tedavisi altında azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur [160, 204]. Aynı yollarda görev alan birçok sitokinde de (IL-1 β , IL-23 vb.) benzer değişimler izlenmiştir [160, 204]. Bu bulgular çalışmamız ile desteklenmiş olup; SMA hastalarının BOS örneklerinde kontrollere kıyasla IL-6 yüksek saptanmış ve tedavi altında IL-6 seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Ancak, ROC eğrisi analizlerinde IL-6 molekülü için tanısal bir sınır değer elde edilememiş ve ileri analizlerde tedavi yanıtını değerlendirmede etkinliği gösterilememiştir.

Th1/Th17 aracılı yolların mikroglia ve astrositleri hedef alarak nöroinflamasyonu uyardığı mevcut çalışmalarla bilinmektedir [207]. Nusinersen tedavisi ile astrositlerde SMN protein restorasyonunun sağlandığı bilinmektedir ve tedavi altında IL-6 sitokin düzeyinde izlenen azalma buna bağlanmıştır [208]. IL-6, SMA için uygun bir biyobelirteç gibi görünmemekle beraber elde edilen bulgular SMA patogeneze glial hücrelerin ve sekonder nöroinflamasyonun katkısını doğrular.

5.5. BİYOBELİRTEÇ ADAYI OLARAK CHİTİNASE-3-LİKE PROTEİN-1 (CHI3L1 veya YKL-40)

Chitinase-3-like protein-1 (YKL-40), merkezi sinir sisteminde mikroglia ve astrositler tarafından eksprese edilen inflamatuvar bir biyobelirteçtir [168]. ALS çalışmalarında YKL-40 seviyelerinin BOS'ta yükseldiği ve yüksekliğinin hastalık ilerleme hızı ve daha kısa sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [166, 209]. Hem glial hücrelerin biyogenezinde hem de inflamatuvar süreçlerde rol oynayan bu

moleküllerin SMA patogenezinin olan katkısı henüz aydınlatılmamıştır. Aynı ailenin bir üyesi olan Chitotriosidase 1 (CHIT1) düzeylerinin SMA hastalarının BOS örneklerinde kontrollere kıyasla yüksek saptandığı ve nusinersen tedavisi altında artış gösterdiği bildirilmiştir [210]. YKL-40 molekülünün SMA hastalarında değerlendirildiği iki çalışma mevcuttur [158, 159]. *Kolb ve ark.* tip 1 tanılı bebeklerde kontrollere kıyasla yüksek serum YKL-40 seviyeleri gözlenmiştir [158]. Fakat, kohortumuzdan elde edilen veriler erişkin SMA hastalarında kontrollere kıyasla YKL-40 seviyelerinde anlamlı farklılık göstermemiştir. Tip 2 ve 3 tanılı hastalarda yapılan bir başka çalışmada ise nusinersen tedavisi altında BOS YKL-40 seviyelerinde azalma bildirilmiştir [157, 159]. Çalışma kohortumuzda da SMA tip 2 ve 3 tanılı hastalarda bu çalışmayı destekleyecek şekilde nusinersen tedavisi ile YKL-40 seviyelerinde azalma gözlenmiştir.

Literatür verileri ve kohortumuzdan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; YKL-40'ın BOS'ta azalan seviyelerinin nusinersen ile tedavi edilen yetişkin SMA hastaların takibinde yol gösterici olduğu söylenebilir. Ayrıca, YKL-40'ın yaşlanma sürecinde önemli ölçüde arttığını savunan önceki çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da hastaların başlangıç örneklerindeki düzeyi yaşla korelasyon göstermiştir [159, 211]. Çalışmamız, erişkin SMA hastalarında BOS YKL-40 düzeylerinin tanısal değerini değerlendiren ilk çalışmadır ve YKL-40 molekülünün tedavi takibinde kullanılabileceğini öneren bir önceki çalışmayı [159] desteklemektedir. Tek başına tanısal karar verdiriciliği bulunmasa da azalan GDNF ve artan GFAP seviyeleri ile kombine edilerek değerlendirildiğinde SMA hastalığını ayırt etmede tanısal rolü vardır.

5.6. NUSİNERSEN TEDAVİSİNE KLİNİK YANITININ ÖN GÖRÜLMESİ AMACIYLA KULLANILABİLECEK BİYOBELİRTEÇLER

SMA'da kullanılan tedavi seçeneklerinin yaygınlaşmasıyla, klinisyenler tedavi yanıtını izlemek ve/veya hastaya özgü klinik yanıt sağlayacak tedaviyi seçebilmek için biyobelirteçlere ihtiyaç duymuştur. Ancak, mevcut çalışmalarla bu ihtiyaç henüz karşılanamamıştır. Nusinersen tedavisi dünyada onaylanan ilk tedavi olması nedeniyle mevcut tedavi seçenekleri içerisinde klinisyenlerin en çok tecrübe ettiği ajandır ve ülkemizde kullanılmakta olan tek tedavi seçeneğidir. Bu çalışma, nusinersen tedavi

yanıtını öngörebilmek adına modelleme sistemi geliştiren ve biyobelirteçlerin bu amaçla kullanımını öneren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızda araştırılan biyobelirteçlerin hiçbiri doğrudan hastaların klinik sonlanımını öngörememiştir. Ancak, hastalarda nusinersen tedavisi sonrası 15. ayda beklenen klinik yanıt, önerilen model ile %68,4 oranında açıklanabilmiştir. Tedavi başlangıç yaşı klinik sonlanıma beklenildiği üzere negatif yönde etki göstermiştir. Bu durum, hastalığın ileri dönemlerinde ortaya çıkan skolyoz vb. iskelet deformitelerinin tedavi yanıtını sınırlamasıyla açıklanabilmektedir. Şaşırtıcı olmamakla beraber *SMN2* kopya sayısı da hastaların klinik sonlanımına doğrudan olmamakla beraber pozitif yönde bir katkı sağlamıştır. BOS incelemesinde GFAP molekülünün artan seviyeleri SMA hastalığı için tanısal olmanın yanı sıra koruyucu özelliğe de sahiptir ve bu amaçla modelde kullanılmıştır. Her ne kadar erişkin SMA hastalarında azalan seviyeleri tanısal özellik gösterse de GDNF molekülü de klinik yanıtta pozitif yönde katkı sağlamıştır. Bu sayede iki klinik parametre (yaş ve *SMN2* kopya sayısı) ve iki biyobelirteç (GFAP ve GDNF) nusinersen tedavisine klinik yanıtı ön görülebilmiştir. Buna ek olarak, başlangıçtaki yüksek BOS GFAP seviyeleri daha iyi klinik sonlanım ile ilişkilendirilmiştir. Mevcut bulgular klinik yanıtı değerlendirmede yol gösterici olup; geniş kohortları içeren kapsamlı çalışmalarla teyit edilmelidir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında, erişkin popülasyonun dahil edilmesi nedeniyle tip 2 hastalarının kohortun küçük bir bölümünü oluşturması sayılabilir. Bu nedenle analizlerde SMA tiplerine göre gruplandırma yapılamamıştır. Benzer şekilde, kontrol grubuna sağlıklı bireyler dahil edildiğinden SMA grubu ile cinsiyet ve yaş açısından eşleştirilememiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışma, astrositler başta olmak üzere glial hücrelerin ve glial hücre aracılı nöroinflamatuvar değişikliklerin SMA patogeneğinde rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. Ek olarak çalışma verileri, SMA hastalarında nöroinflamatuvar sürecin tetiklenmesinde Th1/Th17 aracılı sitokinlerin ve mikrogliya/astrosit aktivasyonunun potansiyel rolünü vurgulamaktadır.

Reaktif gliosis gelişimine yol açan GFAP molekülü, SMA hastalığı hem tanısal hem de prognostik önemi olan bir biyobelirteçtir ve yüksek seviyeleri nusinersen tedavisinde daha iyi klinik sonuçlarla ilişkilidir. GDNF molekülü SMA sürecinde biyolojik olarak aktif rol oynar ve erişkin yaş grubunda azalan seviyeleri tanısaldir. GFAP ve GDNF moleküllerinin ortak analizleri hem tanıda hem de tedavi yanıtını öngörmeye faydalıdır. BOS YKL-40 düzeyleri ise nusinersen alan hastalarda tedavi takibinde kullanılabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile erişkin SMA hastalığı için yeni tanısal ve prognostik biyobelirteçler tanımlanmaktadır. Ayrıca, çalışmada elde edilen veriler, patogeneğinde rol aldığı gösterilmiş glial hücrelere yönelik yeni tedavilerin ve anti-inflamatuvar ajanların SMA tedavisinde kullanımının SMN düzeyini arttıran tedavilerin klinik faydası üzerine olumlu etki yapabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Werdnig, G., *Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis*. 1891. Arch Neurol, 1971. **25**(3): p. 276-8.
2. Hoffmann, J., *Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis*. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 1893. **3**(6): p. 427-470.
3. Hoffmann, J., *Weiterer Beitrag zur Lehre von der progressiven neurotischen Muskelatrophie*. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 1891. **1**(1): p. 95-120.
4. Wohlfart, G., J. Fex, and S. Eliasson, *Hereditary proximal spinal muscular atrophy, a clinical entity simulating progressive muscular dystrophy*. Acta Psychiatr Neurol Scand, 1955. **30**(1-2): p. 395-406.
5. Kugelberg, E. and L. Welander, *Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy*. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1956. **75**(5): p. 500-9.
6. Dubowitz, V., *INFANTILE MUSCULAR ATROPHY. A PROSPECTIVE STUDY WITH PARTICULAR REFERENCE TO A SLOWLY PROGRESSIVE VARIETY*. Brain, 1964. **87**: p. 707-18.
7. Lefebvre, S., et al., *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene*. Cell, 1995. **80**(1): p. 155-65.
8. Zerres, K. and S. Rudnik-Schöneborn, *Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications*. Arch Neurol, 1995. **52**(5): p. 518-23.
9. Brzustowicz, L.M., et al., *Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3*. Nature, 1990. **344**(6266): p. 540-1.

10. Feldkötter, M., et al., *Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(2): p. 358-68.
11. Nance, J.R., *Spinal Muscular Atrophy*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2020. **26**(5): p. 1348-1368.
12. Sugarman, E.A., et al., *Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(1): p. 27-32.
13. Pearn, J., *Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy*. J Med Genet, 1978. **15**(6): p. 409-13.
14. Ogino, S., et al., *Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy*. Am J Med Genet, 2002. **110**(4): p. 301-7.
15. Mailman, M.D., et al., *Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2*. Genet Med, 2002. **4**(1): p. 20-6.
16. Verhaart, I.E.C., et al., *Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review*. Orphanet J Rare Dis, 2017. **12**(1): p. 124.
17. Verhaart, I.E.C., et al., *A multi-source approach to determine SMA incidence and research ready population*. J Neurol, 2017. **264**(7): p. 1465-1473.
18. Mercuri, E., et al., *Spinal muscular atrophy*. Nat Rev Dis Primers, 2022. **8**(1): p. 52.
19. Kolb, S.J. and J.T. Kissel, *Spinal muscular atrophy: a timely review*. Arch Neurol, 2011. **68**(8): p. 979-84.
20. Lefebvre, S., et al., *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene*. Cell, 1995. **80**(1): p. 155-165.
21. Kashima, T. and J.L. Manley, *A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy*. Nature Genetics, 2003. **34**(4): p. 460-463.

22. Cho, S. and G. Dreyfuss, *A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity*. *Genes Dev*, 2010. **24**(5): p. 438-42.
23. Lorson, C.L. and E.J. Androphy, *An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(2): p. 259-65.
24. Mercuri, E., et al., *Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part I: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care*. *Neuromuscul Disord*, 2018. **28**(2): p. 103-115.
25. Prior, T.W., et al., *Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy*. *Am J Med Genet A*, 2010. **152a**(7): p. 1608-16.
26. Calucho, M., et al., *Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases*. *Neuromuscul Disord*, 2018. **28**(3): p. 208-215.
27. Coover, D.D., et al., *The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(8): p. 1205-14.
28. Liu, Q., et al., *The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins*. *Cell*, 1997. **90**(6): p. 1013-21.
29. Miguel-Aliaga, I., et al., *The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(12): p. 2133-43.
30. Chan, Y.B., et al., *Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(12): p. 1367-76.
31. McWhorter, M.L., et al., *Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding*. *The Journal of cell biology*, 2003. **162**(5): p. 919-931.

32. Monani, U.R., et al., *The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(3): p. 333-9.
33. Ramos, D.M., et al., *Age-dependent SMN expression in disease-relevant tissue and implications for SMA treatment.* J Clin Invest, 2019. **129**(11): p. 4817-4831.
34. Statland, J.M., et al., *Patterns of Weakness, Classification of Motor Neuron Disease, and Clinical Diagnosis of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis.* Neurol Clin, 2015. **33**(4): p. 735-48.
35. Dubowitz, V., *Ramblings in the history of spinal muscular atrophy.* Neuromuscular Disorders, 2009. **19**(1): p. 69-73.
36. Mercuri, E., et al., *Development of an academic disease registry for spinal muscular atrophy.* Neuromuscul Disord, 2019. **29**(10): p. 794-799.
37. Bekircan Kurt CE, E.Ö.S., *Motor nöron hastalıklarında genetik incelemeler. Uzun Adatepe N, editör. Motor Nöron Hastalıkları.1. Baskı.. Türkiye Klinikleri, 2023: p. p.58-65.*
38. Munsat, T.L. *International SMA Collaboration.* in *Neuromuscular Disorders.* 1991.
39. Dubowitz, V., *Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype.* European Journal of Paediatric Neurology, 1999. **3**(2): p. 49-51.
40. Macleod, M.J., et al., *Prenatal onset spinal muscular atrophy.* European Journal of Paediatric Neurology, 1999. **3**(2): p. 65-72.
41. Finkel, R.S., et al., *Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials.* Neurology, 2014. **83**(9): p. 810-817.
42. Zerres, K. and S. Rudnik-Schöneborn, *Natural History in Proximal Spinal Muscular Atrophy: Clinical Analysis of 445 Patients and Suggestions for a Modification of Existing Classifications.* Archives of Neurology, 1995. **52**(5): p. 518-523.
43. Thomas, N.H. and V. Dubowitz, *The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy.* Neuromuscular Disorders, 1994. **4**(5): p. 497-502.

44. von Gontard, A., et al., *Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy*. *Neuromuscular Disorders*, 2002. **12**(2): p. 130-136.
45. Zerres, K. and K.E. Davies, *59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17–19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands*. *Neuromuscular Disorders*, 1999. **9**(4): p. 272-278.
46. Zerres, K., et al., *A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients*. *Journal of the Neurological Sciences*, 1997. **146**(1): p. 67-72.
47. Piepers, S., et al., *A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4*. *Journal of Neurology*, 2008. **255**(9): p. 1400-1404.
48. Wang, C.H., et al., *Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy*. *J Child Neurol*, 2007. **22**(8): p. 1027-49.
49. Velasco, E., et al., *Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype*. *Human Molecular Genetics*, 1996. **5**(2): p. 257-263.
50. Rodrigues, N.R., et al., *Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(4): p. 631-4.
51. Feldkotter, M., et al., *Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy*. *Am J Hum Genet*, 2002. **70**(2): p. 358-68.
52. Muqit, M.M., et al., *Phenotypic variability in siblings with type III spinal muscular atrophy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004. **75**(12): p. 1762-4.
53. Gregg, A.R., et al., *Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. *Genet Med*, 2021. **23**(10): p. 1793-1806.

54. Wang, C.H., et al., *Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy*. Journal of Child Neurology, 2007. **22**(8): p. 1027-1049.
55. Finkel, R.S., et al., *Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics*. Neuromuscul Disord, 2018. **28**(3): p. 197-207.
56. Petrone, A., et al., *Noninvasive Ventilation in Children with Spinal Muscular Atrophy Types 1 and 2*. American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, 2007. **86**: p. 216-221.
57. Hull, J., et al., *British Thoracic Society guideline for respiratory management of children with neuromuscular weakness*. Thorax, 2012. **67 Suppl 1**: p. i1-40.
58. Kaufmann, P., et al., *Prospective cohort study of spinal muscular atrophy types 2 and 3*. Neurology, 2012. **79**(18): p. 1889-97.
59. Messina, S., et al., *Feeding problems and malnutrition in spinal muscular atrophy type II*. Neuromuscular Disorders, 2008. **18**(5): p. 389-393.
60. Krosschell, K.J., et al., *Clinical trial of L-Carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy type I*. Muscle Nerve, 2018. **57**(2): p. 193-199.
61. Kissel, J.T., et al., *SMA valiant trial: a prospective, double-blind, placebo-controlled trial of valproic acid in ambulatory adults with spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2014. **49**(2): p. 187-92.
62. Kissel, J.T., et al., *SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21296.
63. Mercuri, E., et al., *Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(2): p. 130-5.
64. Kinali, M., et al., *Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy*. Neurology, 2002. **59**(4): p. 609-10.
65. Kirschner, J., et al., *Somatropin treatment of spinal muscular atrophy: a placebo-controlled, double-blind crossover pilot study*. Neuromuscul Disord, 2014. **24**(2): p. 134-42.

66. Merlini, L., et al., *Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study*. J Child Neurol, 2003. **18**(8): p. 537-41.
67. Russman, B.S., S.T. Iannaccone, and F.J. Samaha, *A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy*. Arch Neurol, 2003. **60**(11): p. 1601-3.
68. Bertini, E., et al., *Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial*. Lancet Neurol, 2017. **16**(7): p. 513-522.
69. Finkel, R.S., et al., *Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy*. N Engl J Med, 2017. **377**(18): p. 1723-1732.
70. Darras, B.T., et al., *Risdiplam-Treated Infants with Type 1 Spinal Muscular Atrophy versus Historical Controls*. N Engl J Med, 2021. **385**(5): p. 427-435.
71. Mendell, J.R., et al., *Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy*. N Engl J Med, 2017. **377**(18): p. 1713-1722.
72. Mercuri, E., et al., *Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy*. N Engl J Med, 2018. **378**(7): p. 625-635.
73. Finkel, R.S., et al., *Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: final report of a phase 2, open-label, multicentre, dose-escalation study*. Lancet Child Adolesc Health, 2021. **5**(7): p. 491-500.
74. Singh, N.N., D. Luo, and R.N. Singh, *Pre-mRNA Splicing Modulation by Antisense Oligonucleotides*. Methods Mol Biol, 2018. **1828**: p. 415-437.
75. Walter, M.C., et al., *Safety and Treatment Effects of Nusinersen in Longstanding Adult 5q-SMA Type 3 - A Prospective Observational Study*. J Neuromuscul Dis, 2019. **6**(4): p. 453-465.
76. Claudia, A.C., et al., *Longer-term Treatment With Nusinersen: Results in Later-onset Spinal Muscular Atrophy From the SHINE Study (1661)*. Neurology, 2020. **94**(15 Supplement): p. 1661.
77. Aragon-Gawinska, K., et al., *Nusinersen in patients older than 7 months with spinal muscular atrophy type 1: A cohort study*. Neurology, 2018. **91**(14): p. e1312-e1318.

78. Pane, M., et al., *Nusinersen in type 1 spinal muscular atrophy: Twelve-month real-world data*. *Ann Neurol*, 2019. **86**(3): p. 443-451.
79. Tiberi, E., et al., *Nusinersen in type 0 spinal muscular atrophy: should we treat?* *Ann Clin Transl Neurol*, 2020. **7**(12): p. 2481-2483.
80. Jochmann, E., et al., *Experiences from treating seven adult 5q spinal muscular atrophy patients with Nusinersen*. *Ther Adv Neurol Disord*, 2020. **13**: p. 1756286420907803.
81. Gómez-García de la Banda, M., et al., *Assessment of respiratory muscles and motor function in children with SMA treated by nusinersen*. *Pediatr Pulmonol*, 2021. **56**(1): p. 299-306.
82. Lorenzo, M., et al., *Nusinersen safety and effects on motor function in adult spinal muscular atrophy type 2 and 3*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2020. **91**(11): p. 1166.
83. Hagenacker, T., et al., *Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study*. *The Lancet Neurology*, 2020. **19**(4): p. 317-325.
84. Jochmann, E., et al., *Experiences from treating seven adult 5q spinal muscular atrophy patients with Nusinersen*. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2020. **13**: p. 1756286420907803.
85. Veerapandiyam, A., et al., *Nusinersen for older patients with spinal muscular atrophy: A real-world clinical setting experience*. *Muscle & Nerve*, 2020. **61**(2): p. 222-226.
86. Walter, M.C., et al., *Safety and Treatment Effects of Nusinersen in Longstanding Adult 5q-SMA Type 3 – A Prospective Observational Study*. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2019. **6**: p. 453-465.
87. Arslan, D., et al., *Nusinersen for adults with spinal muscular atrophy*. *Neurol Sci*, 2023. **44**(7): p. 2393-2400.

88. Coratti, G., et al., *Motor function in type 2 and 3 SMA patients treated with Nusinersen: a critical review and meta-analysis*. Orphanet J Rare Dis, 2021. **16**(1): p. 430.
89. Mondkar, V.P. and R. George, *Spinal muscular atrophy (a report of 44 cases)*. J Postgrad Med, 1983. **29**(4): p. 242-50.
90. Thomas, N.H. and V. Dubowitz, *The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy*. Neuromuscul Disord, 1994. **4**(5-6): p. 497-502.
91. Iannaccone, S.T., et al., *Prospective study of spinal muscular atrophy before age 6 years. DCN/SMA Group*. Pediatr Neurol, 1993. **9**(3): p. 187-93.
92. Claborn, M.K., et al., *Nusinersen: A Treatment for Spinal Muscular Atrophy*. Ann Pharmacother, 2019. **53**(1): p. 61-69.
93. Hoy, S.M., *Nusinersen: First Global Approval*. Drugs, 2017. **77**(4): p. 473-479.
94. Paton, D.M., *Nusinersen: antisense oligonucleotide to increase SMN protein production in spinal muscular atrophy*. Drugs Today (Barc), 2017. **53**(6): p. 327-337.
95. Finkel, R.S., et al., *Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study*. Lancet, 2016. **388**(10063): p. 3017-3026.
96. Chiriboga, C.A., *Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy*. Expert Rev Neurother, 2017. **17**(10): p. 955-962.
97. Foust, K.D., et al., *Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 59-65.
98. Day, J.W., et al., *Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial*. Lancet Neurol, 2021. **20**(4): p. 284-293.
99. Mercuri, E., et al., *Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy type 1 (STRIVE-EU): an open-label,*

- single-arm, multicentre, phase 3 trial*. The Lancet Neurology, 2021. **20**(10): p. 832-841.
100. Friese, J., et al., *Safety Monitoring of Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy with Onasemnogene Apeparvovec -A Single Centre Experience*. J Neuromuscul Dis, 2021. **8**(2): p. 209-216.
 101. Matesanz, S.E., et al., *Clinical Course in a Patient With Spinal Muscular Atrophy Type 0 Treated With Nusinersen and Onasemnogene Apeparvovec*. J Child Neurol, 2020. **35**(11): p. 717-723.
 102. Weiß, C., et al., *Gene replacement therapy with onasemnogene abeparvovec in children with spinal muscular atrophy aged 24 months or younger and bodyweight up to 15 kg: an observational cohort study*. Lancet Child Adolesc Health, 2022. **6**(1): p. 17-27.
 103. Sivaramakrishnan, M., et al., *Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 1476.
 104. Mercuri, E., et al., *Risdiplam in types 2 and 3 spinal muscular atrophy: A randomised, placebo-controlled, dose-finding trial followed by 24 months of treatment*. Eur J Neurol, 2023. **30**(7): p. 1945-1956.
 105. Mercuri, E., et al., *Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2022. **21**(1): p. 42-52.
 106. De Sanctis, R., et al., *Developmental milestones in type I spinal muscular atrophy*. Neuromuscul Disord, 2016. **26**(11): p. 754-759.
 107. Glanzman, A.M., et al., *Validation of the Expanded Hammersmith Functional Motor Scale in spinal muscular atrophy type II and III*. J Child Neurol, 2011. **26**(12): p. 1499-507.
 108. Glanzman, A.M., et al., *Validation of the Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND)*. Pediatr Phys Ther, 2011. **23**(4): p. 322-6.

109. Mazzone, E.S., et al., *Revised upper limb module for spinal muscular atrophy: Development of a new module*. Muscle Nerve, 2017. **55**(6): p. 869-874.
110. de Lattre, C., et al., *Motor function measure: validation of a short form for young children with neuromuscular diseases*. Arch Phys Med Rehabil, 2013. **94**(11): p. 2218-26.
111. Bérard, C., et al., *A motor function measure for neuromuscular diseases. Construction and validation study*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(7): p. 463-70.
112. Dunaway Young, S., et al., *Six-minute walk test is reliable and valid in spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2016. **54**(5): p. 836-842.
113. Mercuri, E., et al., *Patterns of disease progression in type 2 and 3 SMA: Implications for clinical trials*. Neuromuscul Disord, 2016. **26**(2): p. 126-31.
114. Kariyawasam, D.S.T., et al., *Biomarkers and the Development of a Personalized Medicine Approach in Spinal Muscular Atrophy*. Frontiers in Neurology, 2019. **10**.
115. Lapp, H.S., et al., *Biomarkers in 5q-associated spinal muscular atrophy-a narrative review*. J Neurol, 2023.
116. Kang, P.B., et al., *The motor neuron response to SMN1 deficiency in spinal muscular atrophy*. Muscle & nerve, 2014. **49**(5): p. 636-644.
117. Lewelt, A., et al., *Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2010. **42**(5): p. 703-8.
118. Swoboda, K.J., et al., *Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function*. Ann Neurol, 2005. **57**(5): p. 704-12.
119. McComas, A.J., et al., *Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1971. **34**(2): p. 121-31.
120. Bromberg, M.B. and K.J. Swoboda, *Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2002. **25**(3): p. 445-7.
121. Galea, V., et al., *Depletion and sizes of motor units in spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2001. **24**(9): p. 1168-72.

122. Arnold, W.D., D. Kassar, and J.T. Kissel, *Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era*. Muscle Nerve, 2015. **51**(2): p. 157-67.
123. Finkel, R.S., *Electrophysiological and motor function scale association in a pre-symptomatic infant with spinal muscular atrophy type I*. Neuromuscul Disord, 2013. **23**(2): p. 112-5.
124. Tiziano, F.D., G. Neri, and C. Brahe, *Biomarkers in rare disorders: the experience with spinal muscular atrophy*. Int J Mol Sci, 2010. **12**(1): p. 24-38.
125. Baranello, G., et al., *Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy*. N Engl J Med, 2021. **384**(10): p. 915-923.
126. Béchade, C., et al., *Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(1): p. 293-304.
127. Battaglia, G., et al., *Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(11): p. 1961-71.
128. Vezain, M., et al., *A sensitive assay for measuring SMN mRNA levels in peripheral blood and in muscle samples of patients affected with spinal muscular atrophy*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(10): p. 1054-62.
129. Nash, L.A., et al. *Survival Motor Neuron Protein is Released from Cells in Exosomes: A Potential Biomarker for Spinal Muscular Atrophy*. Scientific reports, 2017. **7**, 13859 DOI: 10.1038/s41598-017-14313-z.
130. Czech, C., et al. *Biomarker for Spinal Muscular Atrophy: Expression of SMN in Peripheral Blood of SMA Patients and Healthy Controls*. PloS one, 2015. **10**, e0139950 DOI: 10.1371/journal.pone.0139950.
131. Alves, C.R.R., et al., *Whole blood survival motor neuron protein levels correlate with severity of denervation in spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve, 2020. **62**(3): p. 351-357.
132. Sumner, C.J., et al., *SMN mRNA and protein levels in peripheral blood: biomarkers for SMA clinical trials*. Neurology, 2006. **66**(7): p. 1067-73.

133. Bonati, U., et al., *Longitudinal characterization of biomarkers for spinal muscular atrophy*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2017. **4**(5): p. 292-304.
134. Renusch, S.R., et al., *Spinal Muscular Atrophy Biomarker Measurements from Blood Samples in a Clinical Trial of Valproic Acid in Ambulatory Adults*. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2015. **2**: p. 119-130.
135. Iyer, C., et al., *SMN Blood Levels in a Porcine Model of Spinal Muscular Atrophy*. *Journal of neuromuscular diseases*, 2017. **4**(1): p. 59-66.
136. Wurster, C.D., et al., *Neurochemical markers in CSF of adolescent and adult SMA patients undergoing nusinersen treatment*. *Ther Adv Neurol Disord*, 2019. **12**: p. 1756286419846058.
137. Wurster, C.D., et al., *Routine Cerebrospinal Fluid (CSF) Parameters in Patients With Spinal Muscular Atrophy (SMA) Treated With Nusinersen*. *Front Neurol*, 2019. **10**: p. 1179.
138. Kessler, T., et al., *Cerebrospinal fluid proteomic profiling in nusinersen-treated patients with spinal muscular atrophy*. *J Neurochem*, 2020. **153**(5): p. 650-661.
139. Yuan, A., et al., *Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017. **9**(4).
140. Palermo, G., et al., *Different Clinical Contexts of Use of Blood Neurofilament Light Chain Protein in the Spectrum of Neurodegenerative Diseases*. *Mol Neurobiol*, 2020. **57**(11): p. 4667-4691.
141. Loeffler, T., et al., *Neurofilament-Light Chain as Biomarker of Neurodegenerative and Rare Diseases With High Translational Value*. *Front Neurosci*, 2020. **14**: p. 579.
142. Freigang, M., et al., *Glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of patients with spinal muscular atrophy*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2022. **9**(9): p. 1437-1448.
143. Nitz, E., et al., *Serum neurofilament light chain in pediatric spinal muscular atrophy patients and healthy children*. *Annals of clinical and translational neurology*, 2021. **8**(10): p. 2013-2024.

144. Darras, B.T., et al., *Neurofilament as a potential biomarker for spinal muscular atrophy*. *Ann Clin Transl Neurol*, 2019. **6**(5): p. 932-944.
145. De Vivo, D.C., et al., *Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study*. *Neuromuscul Disord*, 2019. **29**(11): p. 842-856.
146. Totzeck, A., et al., *Neurofilament Heavy Chain and Tau Protein Are Not Elevated in Cerebrospinal Fluid of Adult Patients with Spinal Muscular Atrophy during Loading with Nusinersen*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(21).
147. Wurster, C.D., et al., *Neurofilament light chain in serum of adolescent and adult SMA patients under treatment with nusinersen*. *J Neurol*, 2020. **267**(1): p. 36-44.
148. Faravelli, I., et al., *Nusinersen treatment and cerebrospinal fluid neurofilaments: An explorative study on Spinal Muscular Atrophy type 3 patients*. *J Cell Mol Med*, 2020. **24**(5): p. 3034-3039.
149. Winter, B., et al., *Neurofilaments and tau in CSF in an infant with SMA type 1 treated with nusinersen*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019. **90**(9): p. 1068-1069.
150. Palop, J.J. and L. Mucke, *Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(7): p. 812-8.
151. Alobuia, W.M., W. Xia, and B.P. Vohra, *Axon degeneration is key component of neuronal death in amyloid- β toxicity*. *Neurochem Int*, 2013. **63**(8): p. 782-9.
152. Introna, A., et al., *Is cerebrospinal fluid amyloid- β 42 a promising biomarker of response to nusinersen in adult spinal muscular atrophy patients?* *Muscle Nerve*, 2021. **63**(6): p. 905-909.
153. Abati, E., et al., *Glial cells involvement in spinal muscular atrophy: Could SMA be a neuroinflammatory disease?* *Neurobiol Dis*, 2020. **140**: p. 104870.
154. Abdelhak, A., et al., *Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders*. *Nature Reviews Neurology*, 2022. **18**(3): p. 158-172.

155. Olsson, B., et al., *NFL is a marker of treatment response in children with SMA treated with nusinersen*. J Neurol, 2019. **266**(9): p. 2129-2136.
156. Chiaretti, A., et al., *Increased levels of glial cell-derived neurotrophic factor in CSF of infants with SMA*. Pediatr Neurol, 2009. **41**(3): p. 195-9.
157. Bonne-Barkay, D., et al., *Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation*. Brain Pathol, 2012. **22**(4): p. 530-46.
158. Kolb, S.J., et al., *Baseline results of the NeuroNEXT spinal muscular atrophy infant biomarker study*. Ann Clin Transl Neurol, 2016. **3**(2): p. 132-45.
159. De Wel, B., et al., *Biochemical and clinical biomarkers in adult SMA 3-4 patients treated with nusinersen for 22 months*. Ann Clin Transl Neurol, 2022. **9**(8): p. 1241-1251.
160. Nuzzo, T., et al., *Nusinersen mitigates neuroinflammation in severe spinal muscular atrophy patients*. Commun Med (Lond), 2023. **3**(1): p. 28.
161. Kirk, S.E., et al., *Biomarkers of Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Front Neurol, 2019. **10**: p. 191.
162. Grundström, E., et al., *GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis*. Neuroreport, 2000. **11**(8): p. 1781-3.
163. Stanga, S., et al., *A Role for GDNF and Soluble APP as Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathophysiology*. Front Neurol, 2018. **9**: p. 384.
164. Gonzalez-Garza, M.T., et al., *Adipsin, MIP-1b, and IL-8 as CSF Biomarker Panels for ALS Diagnosis*. Dis Markers, 2018. **2018**: p. 3023826.
165. Trias, E., et al., *Schwann cells orchestrate peripheral nerve inflammation through the expression of CSF1, IL-34, and SCF in amyotrophic lateral sclerosis*. Glia, 2020. **68**(6): p. 1165-1181.
166. Gille, B., et al., *Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019. **90**(12): p. 1338-1346.

167. Sanfilippo, C., et al., *CHI3L1 and CHI3L2 overexpression in motor cortex and spinal cord of sALS patients*. Mol Cell Neurosci, 2017. **85**: p. 162-169.
168. Andrés-Benito, P., et al., *YKL40 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: cerebrospinal fluid levels as a prognosis marker of disease progression*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(9): p. 2367-2382.
169. Thompson, A.G., et al., *CSF chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019. **90**(11): p. 1215-1220.
170. Kothur, K., et al., *CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review*. Cytokine, 2016. **77**: p. 227-37.
171. Park, G.H., et al., *Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene*. J Neurosci, 2010. **30**(36): p. 12005-19.
172. Pehar, M., et al., *Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(33): p. 5010-5021.
173. Philips, T. and J.D. Rothstein, *Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Neurol, 2014. **262 Pt B**: p. 111-20.
174. Misu, T., et al., *Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009. **80**(5): p. 575-7.
175. Araki, S., et al., *Neuropathological analysis in spinal muscular atrophy type II*. Acta Neuropathol, 2003. **106**(5): p. 441-8.
176. Chou, S.M. and A.V. Fakadej, *Ultrastructure of Chromatolytic Motoneurons and Anterior Spinal Roots in a Case of Werdnig-Hoffmann Disease**. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1971. **30**(3): p. 368-379.
177. Ghatak, N.R., *Glial bundles in spinal nerve roots: a form of isomorphic gliosis at the junction of the central and peripheral nervous system*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1983. **9**(5): p. 391-401.

178. Rindt, H., et al., *Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(14): p. 4094-102.
179. AYDINOĞLU, A.T., *İnflamasyon İle İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Dolaşımdaki Mitokondriyal DNA'nın Araştırılması*, in Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi. 2019.
180. Müschen, L.H., et al., *Cerebrospinal Fluid Parameters in Antisense Oligonucleotide-Treated Adult 5q-Spinal Muscular Atrophy Patients*. Brain Sci, 2021. **11**(3).
181. Wurster, C.D., et al. *Routine Cerebrospinal Fluid (CSF) Parameters in Patients With Spinal Muscular Atrophy (SMA) Treated With Nusinersen*. Frontiers in neurology, 2019. **10**, 1179 DOI: 10.3389/fneur.2019.01179.
182. McCudden, C.R., et al., *Cerebrospinal Fluid Total Protein Reference Intervals Derived from 20 Years of Patient Data*. Clin Chem, 2017. **63**(12): p. 1856-1865.
183. Yang, Z. and K.K. Wang, *Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker*. Trends Neurosci, 2015. **38**(6): p. 364-74.
184. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.
185. Jesse, S., et al., *Glial fibrillary acidic protein and protein S-100B: different concentration pattern of glial proteins in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease*. J Alzheimers Dis, 2009. **17**(3): p. 541-51.
186. Fukuyama, R., T. Izumoto, and S. Fushiki, *The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia*. Eur Neurol, 2001. **46**(1): p. 35-8.
187. Sun, M., et al., *A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis*. Mult Scler Relat Disord, 2021. **51**: p. 102870.

188. Zhang, J., et al., *Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for differentiating intracerebral hemorrhage and ischemic stroke in patients with symptoms of acute stroke: a systematic review and meta-analysis*. *Neurol Sci*, 2013. **34**(11): p. 1887-92.
189. Benninger, F., et al., *Glial fibrillary acidic protein as a marker of astrocytic activation in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. *J Clin Neurosci*, 2016. **26**: p. 75-8.
190. Hol, E.M. and M. Pekny, *Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system*. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **32**: p. 121-30.
191. Chou, S.M. and A.V. Fakadej, *Ultrastructure of chromatolytic motoneurons and anterior spinal roots in a case of Werdnig-Hoffmann disease*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 1971. **30**(3): p. 368-379.
192. Saavedra, A., G. Baltazar, and E.P. Duarte, *Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights*. *Prog Neurobiol*, 2008. **86**(3): p. 186-215.
193. Lie, D.C. and J. Weis, *GDNF expression is increased in denervated human skeletal muscle*. *Neurosci Lett*, 1998. **250**(2): p. 87-90.
194. Henderson, C.E., et al., *GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle*. *Science*, 1994. **266**(5187): p. 1062-4.
195. Suzuki, M., et al., *GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS*. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e689.
196. Yamamoto, M., et al., *Expression of GDNF and GDNFR-alpha mRNAs in muscles of patients with motor neuron diseases*. *Neurochem Res*, 1999. **24**(6): p. 785-90.
197. Leitner, M.L., et al., *Analysis of the Retrograde Transport of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Neurturin, and Persephin Suggests That *In Vivo* Signaling for the GDNF Family is GFR α Coreceptor-Specific*. *The Journal of Neuroscience*, 1999. **19**(21): p. 9322-9331.

198. Zhao, Z., et al., *Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy*. *Exp Neurol*, 2004. **190**(2): p. 356-72.
199. Yamamoto, M., et al., *Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and GDNFR-alpha mRNAs in human peripheral neuropathies*. *Brain Res*, 1998. **809**(2): p. 175-81.
200. Klein, S.M., et al., *GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS*. *Human gene therapy*, 2005. **16**(4): p. 509-521.
201. Suzuki, M., et al., *Direct Muscle Delivery of GDNF With Human Mesenchymal Stem Cells Improves Motor Neuron Survival and Function in a Rat Model of Familial ALS*. *Molecular Therapy*, 2008. **16**(12): p. 2002-2010.
202. Burazin, T.C.D. and A.L. Gundlach, *Up-regulation of GDNFR- α and c-ret mRNA in facial motor neurons following facial nerve injury in the rat*. *Molecular Brain Research*, 1998. **55**(2): p. 331-336.
203. Trupp, M., et al., *Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS*. *J Neurosci*, 1997. **17**(10): p. 3554-67.
204. Bonanno, S., et al., *Identification of a cytokine profile in serum and cerebrospinal fluid of pediatric and adult spinal muscular atrophy patients and its modulation upon nusinersen treatment*. *Front Cell Neurosci*, 2022. **16**: p. 982760.
205. Dinarello, C.A., *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 8-27.
206. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 942-9.
207. Prajeeth, C.K., et al., *Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties*. *Journal of Neuroinflammation*, 2017. **14**.

208. Rindt, H., et al., *Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy*. Human molecular genetics, 2015. **24**(14): p. 4094-4102.
209. Thompson, A.G., et al., *Cerebrospinal fluid macrophage biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 2018. **83**(2): p. 258-268.
210. Freigang, M., et al., *Increased chitotriosidase 1 concentration following nusinersen treatment in spinal muscular atrophy*. Orphanet J Rare Dis, 2021. **16**(1): p. 330.
211. Craig-Schapiro, R., et al., *YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 903-12.