



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ / ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διευθυντής: Ευθύμιος Δαρδιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας

Διδακτορική Διατριβή

**«Μελέτη Γενετικών Πολυμορφισμών σε Ασθενείς με Νόσο του Κινητικού
Νευρώνα»**

υπό

Ιωάννη Λιάμπα

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2023

© 2023 ΙΩΑΝΝΗΣ ΛΙΑΜΠΙΑΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3783/28-06-2023)

- 1^{ος} Εξεταστής** Δαρδιώτης Ευθύμιος
(Επιβλέπων) Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Λιάκος Παναγιώτης
Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Νάσιος Γρηγόριος
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Λογοθεραπείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 4^{ος} Εξεταστής** Ανδρούδη Σοφία
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Μπόγδανος Δημήτριος
Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Ξηρομερήσιου Γεωργία
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευρολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Σγάντζος Μάρκος
Αναπληρωτής Καθηγητής Ανατομίας – Ιστορίας της Ιατρικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου και συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην εκπόνηση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Πρωτίστως, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Δρ. Ευθύμιο Δαρδιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας, για την επίβλεψη, καθοδήγηση, στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Ακόμη, στους Δρ. Παναγιώτη Λιάκο, Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, και Δρ. Γρηγόριο Νάσιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Λογοθεραπείας, για την καθοδήγηση και την ουσιαστική μέριμνα στην ολοκλήρωση της εν λόγω διατριβής. Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω όλο το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό της Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής και του Εργαστηρίου Νευρογενετικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, χωρίς τη συνδρομή των οποίων θα ήταν ακατόρθωτη η εκπόνηση της διατριβής. Θα μνημονεύσω ξεχωριστά τον στενό συνεργάτη και φίλο Δρ. Βασίλειο Σιώκα, Ιατρό Νευρολόγο, με τον οποίο συμπορεύομαι από τα πρώτα 'ερευνητικά' μου βήματα. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη στήριξη και κατανόηση που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

Ιωάννης Λιάμπας

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Γεννήθηκα στα Τρίκαλα Θεσσαλίας στις 05 Ιανουαρίου 1993. Το 2011 εισήχθην στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) μέσω της διαδικασίας των Πανελλαδικών Εξετάσεων με βαθμό εισαγωγής 19.523 (9^{ος} εισακτέος). Το 2017 **αποφοίτησα από την Ιατρική του ΑΠΘ ως πρωτεύσας (1^{ος}) αριστούχος με βαθμό πτυχίου Άριστα 9.29**. Την αμέσως επόμενη χρονιά παρακολούθησα το ΠΜΣ “Μεθοδολογία Βιοϊατρικής Έρευνας Βιοστατιστική και Κλινική Βιοπληροφορική” του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (ΠΘ) και **ολοκλήρωσα τις μεταπτυχιακές σπουδές μου με βαθμό πτυχίου Άριστα 9.50**. Από το 2019 μέχρι και σήμερα είμαι στενός **επιστημονικός συνεργάτης** της Νευρολογικής Κλινικής και του Εργαστηρίου Νευρογενετικής του Τμήματος Ιατρικής του ΠΘ και του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Κατά την τριετία 2020-2023 ολοκλήρωσα την παρούσα **διδασκαρική διατριβή** με τίτλο «Μελέτη Γενετικών Πολυμορφισμών σε Ασθενείς με Νόσο του Κινητικού Νευρώνα», υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας Δρ. Ευθύμιου Δαρδιάτη.

Οι ψηφιακές μου ταυτότητες οι οποίες ανανεώνονται τακτικά και παρέχουν πλήρη πρόσβαση στο επιστημονικό μου έργο είναι οι εξής: <https://orcid.org/0000-0002-2958-5220> και <https://www.webofscience.com/wos/author/record/AAL-2713-2020>. Συνοπτικά, τα κύρια ερευνητικά μου ενδιαφέροντα αφορούν στα πεδία της Νευρογενετικής, των Γνωστικών Νευροεπιστημών και Νευρογνωστικών Διαταραχών, καθώς επίσης της περιγραφικής και αναλυτικής Επιδημιολογίας των Νευρολογικών Παθήσεων.

Έχω συμμετέχει στην **εκπόνηση περισσότερων των 65 επιστημονικών δημοσιεύσεων** σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (πρώτος ή ισάξιος πρώτος συγγραφέας περίπου στις μισές εξ αυτών) και στη **συγγραφή 2 κεφαλαίων σε ξενόγλωσσα βιβλία** του κορυφαίου οίκου επιστημονικών εκδόσεων Elsevier (πρώτος συγγραφέας στο 1 εξ αυτών). Παράλληλα, έχω συμμετέχει σε πολλαπλές επιστημονικές εργασίες που έχουν

παρουσιαστεί σε **εγχώρια και διεθνή συνέδρια**. Είμαι κριτής επιστημονικών εργασιών (**Reviewer**) σε περισσότερα από **60 διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά** (έχοντας αναλάβει συνολικά **περισσότερα από 100 επιστημονικά άρθρα**) και μέλος συντακτικής ομάδας (**Editorial Service**) σε **5**.

Το **διδακτικό έργο** μου συνοψίζεται στα παρακάτω: από το 2020 μέχρι και σήμερα συμμετέχω στη διδασκαλία (αρχικά ως διδάσκων κι εν συνεχεία ως υπεύθυνος) του μαθήματος “Μεθοδολογία της Έρευνας και Βιοστατιστική στις Νευροεπιστήμες” του ΠΜΣ “Νευροαποκατάσταση” του ΠΘ. Από το 2022 μέχρι και σήμερα συμμετέχω στη διδασκαλία και κλινική εκπαίδευση των προπτυχιακών φοιτητών Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Όσον αφορά στην εργασιακή μου εμπειρία, έχω εργαστεί ως **Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου** σε Απομακρυσμένα Περιφερειακά Ιατρεία και Κέντρα Υγείας του νομού Τρικάλων, ως **Ειδικευόμενος Παθολογίας** στην Β Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων, ως **Ειδικευόμενος Νευρολογίας** στη Νευρολογική Κλινική του 424 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Εκπαιδευσεως και για μικρό χρονικό διάστημα ως Ιατρός σε **Ιδιωτική Ψυχιατρική Κλινική**. Πλέον εργάζομαι ως **Ειδικευόμενος Νευρολογίας** στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών. Τέλος, έχω ολοκληρώσει τις **στρατιωτικές υποχρεώσεις** υπηρετώντας ως υγειονομικός με την ειδικότητα του Ιατρού στην 50 ΜΚ ΤΑΞΠΖ (Σουφλί Έβρου) και στη ΣΜΥ (Τρίκαλα Θεσσαλίας).

**«Μελέτη Γενετικών Πολυμορφισμών σε Ασθενείς με Νόσο του Κινητικού
Νευρώνα»**

Ιωάννης Λιάμπας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ευθύμιος Δαρδιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπων)
2. Παναγιώτης Λιάκος, Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Γρηγόριος Νάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Λογοθεραπείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Περίληψη

Εισαγωγή: Παρόλο που στην πλειοψηφία τους οι περιπτώσεις ασθενών με νόσο κινητικού νευρώνα (NKN) είναι σποραδικές, ένα 10% του συνόλου των περιπτώσεων πάσχει από οικογενή NKN. Στο υπόλοιπο 90% η κληρονομικότητα αποτελεί επίσης έναν ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα με περίπου 50% της μεταβλητότητας κινδύνου νόσησης να εξηγείται γενετικά. Μέχρι σήμερα έχει ανακαλυφθεί κατά προσέγγιση το 10% της γενετικής βάσης της NKN. Στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) 1) MOBP rs616147 και 2) SCFD1 rs10139154 έχουν συσχετιστεί με NKN στον δυτικό-ευρωπαϊκό και αμερικάνικο πληθυσμό αλλά όχι στον ασιατικό (μη σημαντικά αποτελέσματα), ενώ απουσιάζει πλήρως η διερεύνηση αυτών των πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Από την άλλη, ο ρόλος του 3) CD33 rs3865444 (υπαισέρχεται στη ρύθμιση και ισορροπία της φλεγμονώδους απόκρισης) δεν έχει μελετηθεί καθόλου στη NKN, σε κανέναν πληθυσμό. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των εν λόγω πολυμορφισμών και της NKN.

Μεθοδολογία: Διενεργήθηκε μία προοπτική μελέτη πασχόντων-μαρτύρων που ακολουθεί της αρχές των candidate gene analyses (μελέτες υποψήφιων γονιδίων). Οι συμμετέχοντες εντοπίστηκαν προοπτικά στη Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Πρόταση συμμετοχής απευθύνθηκε διαδοχικά σε κάθε ενήλικα ασθενή με NKN που παρουσιάστηκε στη Νευρολογική κλινική μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού μεγέθους δείγματος. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα αναθεωρημένα κριτήρια EI-Escorial και καθιερώθηκε από έναν ειδικό νευρολόγο με εμπειρία στις νευρομυικές διαταραχές. Παράλληλα, υγιείς μάρτυρες από την κοινότητα επιλέχθηκαν τυχαία, με τη διαδικασία της εξατομικευμένης αντιστοίχισης βάσει φύλου και ηλικίας (± 2 έτη) με τους πάσχοντες. Η απομόνωση του DNA έγινε από εμπύρηννα λευκοκύτταρα με βάση τη μέθοδο της εξαλάτωσης. Ως πρωταρχικές εκβάσεις ορίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των

πολυμορφισμών MOBPs rs616147, CD33 rs3865444, και SCFD1 rs10139154 και της NKN (chi-squared tests – odds ratios). Ως δευτερεύουσες εκβάσεις ορίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των εν λόγω SNPs και της ηλικίας έναρξης της NKN (Cox proportional hazards models).

Αποτελέσματα: Συνολικά, στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 155 ασθενείς με NKN και 155 υγιείς μάρτυρες εξατομικευμένα αντιστοιχισμένοι βάσει ηλικίας και φύλου. Η γονοτύπηση ήταν επιτυχημένη σε >98% των περιπτώσεων, ως προς κάθε πολυμορφισμό. Επετεύχθη στατιστική ισχύς άνω του 80% για κάθε ανάλυση. Όλοι οι πολυμορφισμοί βρισκόταν σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg στους υγιείς μάρτυρες. Εκ της στατιστικής ανάλυσης, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των MOBPs rs616147, CD33 rs3865444 και SCFD1 rs10139154 και της παρουσίας NKN, σύμφωνα με όλα τα μοντέλα κληρονομικότητας (επικρατής-dominant, υπολειπόμενος-recessive, συν-επικρατής-co-dominant, υπερ-κυρίαρχος-over-dominant και συσσωρευτικός-additive τύπος). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τόσο μη σταθμισμένα – όσο και σταθμισμένα ως προς το φύλο μοντέλα επιβίωσης, οι αναλύσεις επιβίωσης ανέδειξαν πως οι εν λόγω πολυμορφισμοί δεν επιδρούν στην ηλικία έναρξης της νόσου.

Συζήτηση: Στον ελληνικό πληθυσμό, οι πολυμορφισμοί MOBPs rs616147, CD33 rs3865444 και SCFD1 rs10139154 δεν σχετίζονται με την παρουσία σποραδικής NKN, ούτε επιδρούν στην ηλικία έναρξης της νόσου.

Abstract

Introduction: Although the majority of cases with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are sporadic, about 10% are familial. Regarding the remaining 90%, heritability is considered to play an important role as well, with about 50% of the total risk variance being explained by genetics. Only 10% of the genetic architecture of ALS has been captured to date. Published literature suggests that single nucleotide polymorphisms (SNPs) 1) MOBP rs616147 and 2) SCFD1 rs10139154 are associated with ALS in western European and (southern) American populations but not in Asian ones, whereas there has been no relevant research involving individuals of Greek ancestry. On the other hand, the role of 3) CD33 rs3865444 (which is implicated in the regulation of inflammatory responses) has never been explored in ALS, in any population. The purpose of the current thesis was to examine the relationship between the three aforementioned SNPs and ALS in a well-defined Greek population.

Methods: A prospective case-control study that adheres to the principles of candidate gene analyses was conducted. Patients with ALS were recruited from the Neurology department of the University General Hospital of Larissa. Consecutive invitations were addressed to every adult patient with ALS that visited the Neurology department, until achieving the prespecified sample size. The diagnosis of ALS was established according to the El-Escorial criteria by an expert neurologist with experience in neuromuscular disorders. In parallel, community-based healthy controls were randomly selected via individualized matching based on age (± 2 years) and sex. DNA was isolated from nucleated white blood cells through the salting out method. The primary outcomes of the current study were the relationship between the SNPs MOBP rs616147, CD33 rs3865444, and SCFD1 rs10139154 and ALS (chi-squared tests – odds ratios). The association of the aforementioned SNPs with the age of ALS onset were defined as secondary outcomes (Cox proportional hazards models).

Results: A total of 155 patients with ALS as well as 155 age and sex (individually) matched healthy controls were included. Genotyping was successful in >98% of the cases, with respect to every SNP. The power of our sample was >80% with respect to every analysis. All SNPs were found in Hardy-Weinberg equilibrium in the group of healthy controls. Statistical analysis revealed that MOB1 rs616147, CD33 rs3865444, and SCFD1 rs10139154 were not related to the presence of ALS based on any heritability pattern (dominant, recessive, co-dominant, over-dominant, additive). Moreover, using both unadjusted as well as sex-adjusted Cox models, none of the aforementioned SNPs was associated with the age of ALS onset.

Discussion: MOB1 rs616147, CD33 rs3865444, and SCFD1 rs10139154 are neither related to the presence of ALS nor to the age of ALS onset in individuals of Greek ancestry.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	8
Abstract.....	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
Γενικά περί νόσου κινητικού νευρώνα.....	15
Ανατομικές δομές: ανώτερος (AKN) και κατώτερος κινητικός νευρώνας (KKN)....	16
Διαταραχές σε προσβολή του ανώτερου κινητικού νευρώνα (AKN).....	18
Διαταραχές σε προσβολή του περιφερικού κινητικού νευρώνα (KKN).....	19
Διάγνωση και ταξινόμηση.....	20
Αναθεωρημένα κριτήρια El Escorial.....	21
Κριτήρια Awaji.....	25
Κριτήρια Gold Coast.....	26
Επιδημιολογία.....	27
Παθοφυσιολογία.....	28
Ιστοπαθολογία.....	29
Γενετική αρχιτεκτονική της νόσου κινητικού νευρώνα.....	30
Linkage studies.....	30
SOD-1.....	31
TDP-43.....	31
FUS.....	32
C9orf72.....	32
Candidate gene analysis.....	32
Genome-wide association studies (GWASs).....	33
Whole-exome sequencing (WES) & Whole-genome sequencing (WGS).....	33

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν την προδιάθεση για ΝΚΝ.....	34
Κλινική εικόνα.....	35
Κινητικά συμπτώματα.....	35
Μη κινητικά συμπτώματα.....	38
Αντιμετώπιση.....	40
Θεραπείες που επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου.....	40
Υποστηρικτική-συμπτωματική θεραπεία.....	42
Πρόγνωση.....	42
Διαφορική διάγνωση και παραλλαγές.....	44
Ασθενείς με σημεία προσβολής ΚΚΝ.....	44
Ασθενείς με σημεία προσβολής ΑΚΝ.....	49
Μυοπάθειες.....	50
Νοσήματα της νευρομυϊκής σύναψης - Μυασθένεια Gravis (MG).....	51
Άλλες οντότητες με προεξάρχουσα προσβολή του ΑΚΝ ή/και ΚΚΝ.....	51
Γενικά περί SNPs.....	52
Υπό μελέτη SNPs.....	53
MOBP rs616147.....	53
SCFD1 rs10139154.....	55
CD33 rs3865444.....	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
Σκοπός.....	57
Μεθοδολογία.....	57
Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.....	57
Εργαστηριακές τεχνικές.....	59

Απομόνωση DNA.....	59
Προσδιορισμός ποσότητας και συγκέντρωσης DNA.....	64
Polymerase chain reaction – PCR	65
Γονοτύπηση κατά Taqman.....	66
Στατιστική ανάλυση.....	67
Αποτελέσματα.....	69
MOBP rs616147.....	70
SCFD1 rs10139154.....	72
CD33 rs3865444.....	74
Συζήτηση.....	76
Περιορισμοί.....	82
Συμπέρασμα.....	83
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	 84

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

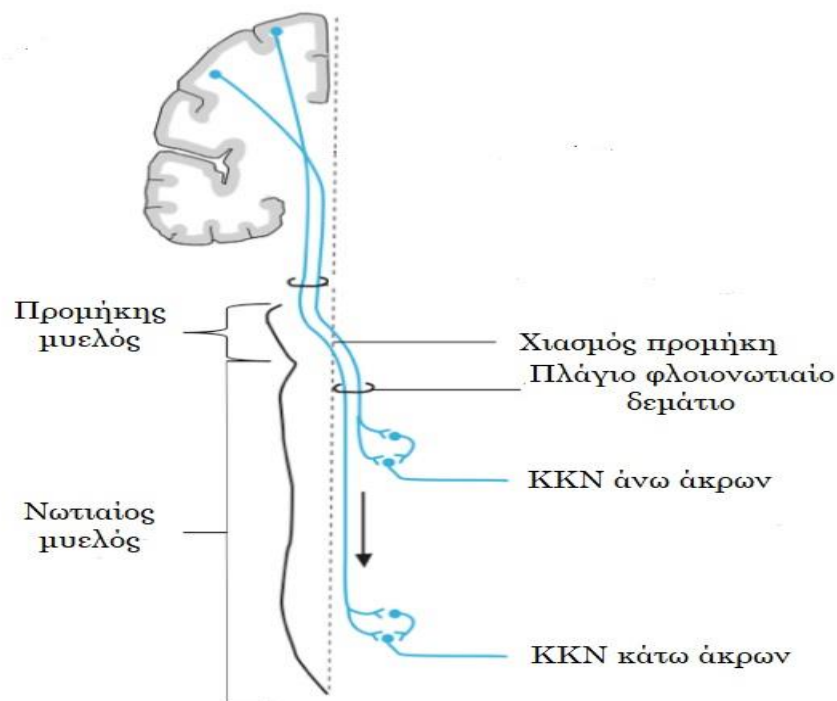
Γενικά περί νόσου κινητικού νευρώνα

Η πρώτη αναλυτική κλινικο-ανατομική περιγραφή της νόσου του κινητικού νευρώνα (NKN) ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα τοποθετείται χρονολογικά στο 2^ο μισό του 19^{ου} αιώνα και αποδίδεται στον Γάλλο παθολογοανατόμο Jean-Martin Charcot (1). Ο όρος πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (ΠΜΣ) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά επίσημα το 1974, στη συλλογή του Jean-Martin Charcot “Oeuvres Completes”, και έκτοτε η νόσος, σε πολλά σημεία του κόσμου είναι γνωστή και ως νόσος του Charcot (2). Η NKN έγινε ευρύτερα γνωστή στο μη ιατρικό κοινό το 1941, όταν ο διάσημος παίκτης του baseball, Lou Gehrig, απεβίωσε, 2 χρόνια μετά από τη διάγνωση της νόσου (3). Έπειτα και για πολλά χρόνια η νόσος ήταν γνωστή στο ευρύ κοινό ως νόσος του Lou Gehrig.

Η NKN ορίζεται ως μία προοδευτικά επιδεινούμενη νευροεκφυλιστική διαταραχή που προσβάλλει εκλεκτικά τους κινητικούς νευρώνες, δηλαδή τα νευρικά κύτταρα που εμπλέκονται στον εκτελεστικό μηχανισμό της συνειδητής κινητικής λειτουργίας (4). Το σημείο κατατεθέν της NKN είναι η απώλεια-εκφύλιση των ανώτερων (AKN - κινητικός φλοιός πρόσθιας κεντρικής έλικας μετωπιαίου λοβού) και κατώτερων κινητικών νευρώνων (KKN - πρόσθια κέρατα νωτιαίου μυελού ή/και κινητικοί πυρήνες εγκεφαλικού στελέχους) (4). Παρά την ταυτόσημη χρήση των όρων NKN-ΠΜΣ στη βιβλιογραφία, το φάσμα της NKN περιλαμβάνει κι άλλες, σπανιότερες, φαινοτυπικά πιο περιορισμένες μορφές, οι οποίες εκδηλώνονται με κατεξοχήν προσβολή του ANK ή KKN (5). Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στον πλέον συχνότερο τύπο NKN, την ΠΜΣ, και η χρήση των δύο όρων είναι ταυτόσημη σε όλη την έκταση του κειμένου, εκτός κι διευκρινίζεται το αντίθετο.

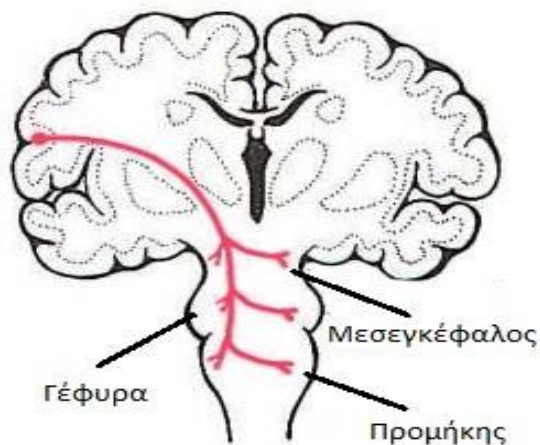
Ανατομικές δομές: ανώτερος και κατώτερος κινητικός νευρώνας

Οι ΑΚΝ άρχονται από τον πρωτοπαθή κινητικό φλοιό που εδράζεται στην πρόσθια κεντρική έλικα του μετωπιαίου λοβού (6). Η λειτουργία τους συνίσταται στη μεταφορά σημάτων που αφορούν στην εθελούσια κινητική δραστηριότητα από τον εγκεφαλικό φλοιό στους ΚΚΝ. Οι νευράξονες των ΑΚΝ οργανώνονται σε δύο κατιόντα δεμάτια, το φλοιονωτιαίο και το φλοιοπρομηκικό, τα οποία από κοινού απαρτίζουν την κατιούσα πυραμιδική οδό και προβάλλουν στους κινητικούς πυρήνες των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού (NM) και των κρανιακών νEURων, αντίστοιχα (6). Συγκεκριμένα, το φλοιονωτιαίο δεμάτιο διασχίζει το εγκεφαλικό στέλεχος και το μεγαλύτερο μέρος του (~90%) χιάζεται στο ύψος του προμήκη μυελού (χιασμός του προμήκη) για να συνεχίσει ως πλάγιο πυραμιδικό δεμάτιο, το οποίο και καταλήγει στους κινητικούς πυρήνες των πρόσθιων κεράτων του NM (7). Το υπόλοιπο ~10% του φλοιονωτιαίου δεματίου συνεχίζει αχίαστο, ως πρόσθιο φλοιονωτιαίο δεμάτιο.



Εικόνα 1 Φλοιονωτιαία δεσμίδα

Από την άλλη πλευρά, οι κινητικοί πυρήνες των κρανιακών συζυγίων δέχονται αμφοτερόπλευρη φλοιική νεύρωση, με εξαίρεση τον κάτω (κοιλιακό) πυρήνα του προσωπικού και τον πυρήνα του υπογλώσσιου νεύρου, στους οποίους προβάλλει αποκλειστικά το ετερόπλευρο φλοιοπρομηκικό δεμάτιο (8).



Εικόνα 2 Φλοιοπρομηκική δεσμίδα

Οι ΚΚΝ άρχονται είτε από τους κινητικούς πυρήνες των κρανιακών νεύρων ή από τους κινητικούς πυρήνες των πρόσθιων κεράτων του ΝΜ και οι νευράξονες τους οργανώνονται στα περιφερικά νεύρα (κρανιακά ή νωτιαία) τα οποία και νευρώνουν τους περιφερικούς μύες (9). Η συναπτική σύνδεση των ΚΚΝ και των μυών γίνεται στη νευρομυϊκή σύναψη, όπου το προσυναπτικό δυναμικό ενέργειας οδηγεί στην απελευθέρωση μορίων ακετυλοχολίνης (ACh) στη συναπτική σχισμή, τα οποία με τη σειρά τους αλληλοεπιδρούν με τους υποδοχείς ACh της μετασυναπτικής μεμβράνης (10).

Διαταραχές σε προσβολή του ανώτερου κινητικού νευρώνα (AKN)

Οι ΑΚΝ και ΚΚΝ αποτελούν τμήμα του εκτελεστικού κινητικού μηχανισμού. Στην κλινική πράξη, η πυραμιδική σημειολογία (προσβολή του ΑΚΝ) οφείλεται πρωτίστως σε διακοπή των ανασταλτικών ινών που διοχετεύουν ανασταλτικές ώσεις στους κινητικούς νευρώνες και περιλαμβάνει τα παρακάτω (11):

1. Αύξηση του μυϊκού τόνου: στην πυραμιδική συνδρομή η υπερτονία αναφέρεται και ως σπαστικότητα (σε αντίθεση με την “εξωπυραμιδική δυσκαμψία”). Χαρακτηριστικά, η κατανομή της σπαστικότητας είναι ανομοιόμορφη: πιο αυξημένος μυϊκός τόνος στους καμπτήρες (σε σχέση με τους εκτείνοντες) στα άνω άκρα και πιο αυξημένος μυϊκός τόνος στους εκτείνοντες (σε σχέση με τους καμπτήρες) στα κάτω άκρα.
2. Αύξηση των μυοτατικών αντανακλαστικών: αφορά τόσο στα τενόντια αντανακλαστικά των άκρων όσο και στα μυοτατικά αντανακλαστικά του στελέχους. Εκτός από ζωνρότητα, μπορεί να παρατηρείται επέκταση της αντανακλασσιογόνου ζώνης και διάχυση της αντανακλαστικής αντίδρασης.
3. Παρουσία παθολογικών πυραμιδικών αντανακλαστικών: Χαρακτηριστικά είναι τα σημεία Babinski και Hoffman.
4. Ελάττωση ή κατάργηση των επιπολής αντανακλαστικών: αφορά τόσο στα κοιλιακά όσο και στα κρεμαστήρια αντανακλαστικά (εκτός του νωτιαίου αντανακλαστικού τόξου, τα επιπολής αντανακλαστικά περιέχουν και φλοιικό τόξο).
5. Μυϊκή αδυναμία: στην πυραμιδική συνδρομή η μυϊκή αδυναμία αναφέρεται ως σπαστική πάρεση (ή παράλυση) που οφείλεται στη συνύπαρξη υπερτονίας. Η πάρεση συνήθως έχει ανομοιόμορφη κατανομή. Χαρακτηριστικά, πιο επιρρεπής για λειτουργική έκπτωση μετά από πυραμιδική προσβολή είναι οι λεπτές κινήσεις επιδεξιότητας.

6. Ψευδοπρομηκική παράλυση: οφείλεται σε αμφοτερόπλευρη υπερπυρηνική προσβολή με άρση των ανασταλτικών ώσεων προς των κινητικών πυρήνων του στελέχους. Ο όρος “ψευδο-” τη διαχωρίζει από την προμηκική παράλυση που οφείλεται σε προσβολή των ΚΚΝ. Πλην της σπαστικής δυσαρθρίας-δυσφωνίας και δυσφαγίας, συνοδεύεται από συναισθηματική ακράτεια με απρόσφορες (αυθόρμητες – χωρίς εκλυτικό αίτιο) εκρήξεις κλάματος ή γέλιου.

Διαταραχές σε προσβολή του περιφερικού κινητικού νευρώνα (ΚΚΝ)

Στην κλινική πράξη, σε προσβολή του ΚΚΝ παρατηρούνται κυρίως τα παρακάτω (9):

1. Μυϊκή αδυναμία μέχρι και τέλεια παράλυση: χαλαρή λόγω της υποτονίας που τη συνοδεύει, καταλαμβάνει μεμονωμένους μύες ή ομάδες μυών. Αναλόγως του επιπέδου της προσβολής (πρόσθια κέρατα, ρίζες, περιφερικά νεύρα), αναμένονται διαφορετικά πρότυπα κατανομής της αδυναμίας.
2. Υποτονία ή ελάττωση του μυϊκού τόνου ομοιόμορφα κατανεμημένη στους παρετικούς μύες.
3. Ελάττωση ή κατάργηση των επιπολής και εν τω βάθει αντανακλαστικών: τόσο των νωτιαίων όσο και του στελέχους.
4. Ατροφία: απώλεια μυϊκής μάζας που καταλαμβάνει μεμονωμένους μύες - ομάδες μυών. Αναλόγως του επιπέδου της προσβολής (πρόσθια κέρατα, ρίζες, περιφερικά νεύρα), αναμένονται διαφορετικά πρότυπα κατανομής της ατροφίας.
5. Δεσμιδώσεις: οφείλονται κυρίως σε προσβολή των πρόσθιων κεράτων ή πρόσθιων ριζών
6. Προμηκική παράλυση με χαλαρή δυσαρθρία και δυσκαταποσία.
7. Ηλεκτροφυσιολογικές μεταβολές: γίνεται λόγος πιο αναλυτικά στη συνέχεια.

Διάγνωση και ταξινόμηση

Τα κριτήρια El Escorial για τη διάγνωση της NKN δημοσιεύτηκαν αρχικά το 1994 (12) και αναθεωρήθηκαν το 2000 (13). Στη συνέχεια, το 2008, τα κριτήρια Awaji επιχείρησαν να τροποποιήσουν περαιτέρω τα αναθεωρημένα κριτήρια El Escorial με σκοπό να ενσωματώσουν πιο αποτελεσματικά τα ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα στη διαγνωστική προσέγγιση και να αυξήσουν την ευαισθησία της (14). Παρόλα αυτά, ενώ ορισμένες μελέτες επιβεβαίωσαν μια μέτρια αύξηση της ευαισθησίας (15), άλλες ανέφεραν ελάττωση της ευαισθησίας, η οποία αποδόθηκε πρωτίστως στην εξάλειψη της κατηγορίας “Κλινικά πιθανή – εργαστηριακά υποστηριζόμενη NKN”, και τα μέλη της οποίας ταξινομήθηκαν στην κατηγορία “Κλινικά δυνατή NKN” (16).

Παρά την υψηλή ειδικότητα αμφοτέρων των ανωτέρω κριτηρίων (17), η υποβέλτιστη ευαισθησία τους, η πολυπλοκότητα στην εφαρμογή τους και οι πολλαπλές κατηγορίες που ορίζονται με βάση το επίπεδο διαγνωστικής βεβαιότητας, οδήγησαν στη δημοσίευση των κριτηρίων Gold Coast το 2019 (18). Τα εν λόγω κριτήρια, ενώ ομολογουμένως βελτίωσαν τη διαγνωστική ευαισθησία και απλοποίησαν τη διαγνωστική προσέγγιση (19) φαίνεται να επισύρουν ταυτόχρονα μία ήπια μείωση της ειδικότητας (20,21).

Αναθεωρημένα κριτήρια El Escorial (13)

Ένα αναλυτικό ιστορικό και μία σχολαστική κλινική εξέταση πρέπει να κατευθύνονται στην ανάδειξη κλινικών ενδείξεων εκφύλισης των Α-ΚΚΝ στις 4 περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ): εγκεφαλικό στέλεχος, αυχενική μοίρα σπονδυλικής στήλης (ΑΜΣΣ), θωρακική ΜΣΣ (ΘΜΣΣ) και οσφυοιερή ΜΣΣ (ΟΜΣΣ). Επικουρικές διαγνωστικές εξετάσεις πρέπει να επιστρατεύονται για τον αποκλεισμό άλλων νοσολογικών οντοτήτων: ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος, απεικονιστικές εξετάσεις, αιματολογικές και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις.

Η διάγνωση της ΝΚΝ απαιτεί την παρουσία των (Α) ταυτόχρονα με την απουσία των (Β):

- (Α1) Ενδείξεις εκφύλισης του ΚΚΝ (κατά την κλινική, ηλεκτροφυσιολογική, ή παθολογοανατομική εξέταση)
- (Α2) Ενδείξεις εκφύλισης του ΑΚΝ κατά την κλινική εξέταση
- (Α3) Προοδευτική εξάπλωση των συμπτωμάτων-σημείων σε μία περιοχή ή σε άλλες περιοχές, διαπιστωμένη είτε από το ιστορικό είτε από την κλινική εξέταση.
- (Β1) Ηλεκτροφυσιολογικές ή παθολογοανατομικές ενδείξεις άλλων νοσολογικών διεργασιών που να εξηγούν επαρκώς τα συμπτώματα-σημεία εκφύλισης των ΑΚΝ και ΚΚΝ.
- (Β2) Απεικονιστικές ενδείξεις άλλων νοσολογικών διεργασιών που να εξηγούν επαρκώς τα κλινικά και ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα.

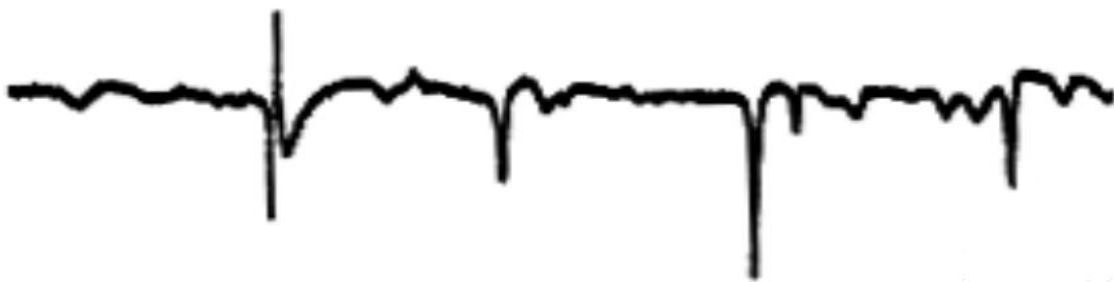
Η διάγνωση της νόσου μπορεί να καθιερωθεί με διαφορετικά επίπεδα βεβαιότητας:

- Κλινικά βέβαιη ΝΚΝ: κλινικά σημεία εκφύλισης ΑΚΝ και ΚΚΝ σε 3 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ (εγκεφαλικό στέλεχος + 2 εκ των 3 περιοχών της ΣΣ ή ταυτόχρονα στις 3 περιοχές της ΣΣ: ΑΜΣΣ-ΘΜΣΣ-ΟΜΣΣ)

- Κλινικά πιθανή NKN: κλινικά σημεία εκφύλισης AKN και KKN σε 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ με κάποια σημεία εκφύλισης AKN άνωθεν των σημείων εκφύλισης του KKN.
- Κλινικά πιθανή – εργαστηριακά υποστηριζόμενη NKN: κλινικά σημεία εκφύλισης AKN και KKN σε 1 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ ή αποκλειστικά κλινικά σημεία εκφύλισης AKN σε 1 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ, και ηλεκτροφυσιολογικές ενδείξεις εκφύλισης KKN σε τουλάχιστον 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ.
- Κλινικά δυνατή NKN: κλινικά σημεία εκφύλισης AKN και KKN σε 1 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ ή αποκλειστικά κλινικά σημεία εκφύλισης AKN σε τουλάχιστον 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ ή κλινικά σημεία εκφύλισης KKN άνωθεν των σημείων προσβολής του AKN και η “κλινικά πιθανή – εργαστηριακά υποστηριζόμενη διάγνωση NKN” δε δύναται να καθιερωθεί ηλεκτροφυσιολογικά.

Συνοπτικά, στα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά προσβολής KKN των κριτηρίων EI Escorial λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω: παρουσία συνδυασμού σημείων ενεργούς και χρόνιας απονεύρωσης στον συμβατικό ηλεκτρομυογραφικό (ΗΜΓ) έλεγχο:

1. Σημεία ενεργούς απονεύρωσης: ινιδικά δυναμικά και θετικά αιχμηρά κύματα.



Εικόνα 3 Ινιδικό δυναμικό και θετικά αιχμηρά κύματα

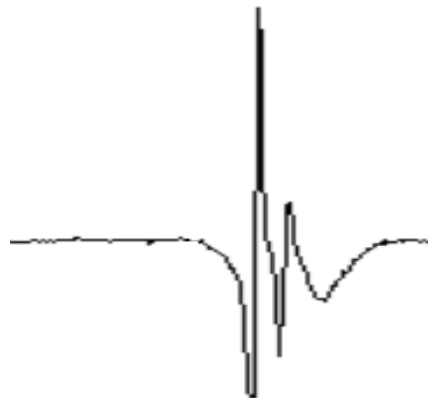
2. Σημεία χρόνιας απονεύρωσης: μεγάλα δυναμικά κινητικών μονάδων (μεγάλης διάρκειας και εύρους, με αυξημένη αναλογία πολυφασικών δυναμικών), μειωμένο διάγραμμα συμβολής με αυξημένους ρυθμούς εκφόρτισης (άνω των 10Hz) μειωμένου

αριθμού κινητικών μονάδων (σε πλέον εκσεσημασμένη προσβολή του ΑΚΝ οι ρυθμοί εκφόρτισης μπορεί να είναι μικρότεροι των 10Hz) και ασταθή-σύνθετα δυναμικά κινητικών μονάδων.



Εικόνα 4 Νευρογενές διάγραμμα συμβολής

3. Οι δεσμιδώσεις (δεσμιδικά δυναμικά) είναι ένα χαρακτηριστικό εύρημα στη ΝΚΝ. Η παρουσία τους είναι επικουρική στη διάγνωση της νόσου, ιδιαίτερα όταν είναι μεγάλης διάρκειας με πολυφασία. Η απουσία τους επισύρει διαγνωστικές αμφιβολίες, αλλά δεν αποκλείει τη διάγνωση. Δεσμιδώσεις με φυσιολογική μορφολογία μπορεί να εντοπιστούν σε φυσιολογικά άτομα (καλοήθειες δεσμιδώσεις), ενώ παθολογικές δεσμιδώσεις μπορεί να παρατηρηθούν και σε άλλες νοσολογικές οντότητας με απονεύρωση (π.χ., κινητικές νευροπάθειες).



Εικόνα 5

Δεσμιδικό δυναμικό (σύνθετη μορφή)

4. Όσον αφορά στην περιοχή του εγκεφαλικού στελέχους, η παρουσία ΗΜΓ σημείων προσβολής του ΚΚΝ αρκεί να επιβεβαιωθεί σε έναν μυ (π.χ., γλώσσα, μμικοί, μασητήρες). Όσον αφορά στην περιοχή της ΘΜΣΣ, η παρουσία ΗΜΓ σημείων προσβολής του ΚΚΝ αρκεί να επιβεβαιωθεί στους παρασπονδυλικούς μύες στο επίπεδο Θ6-Θ10 (αποφυγή διαστρέβλωσης ευρημάτων λόγω επικαλυπτόμενης νεύρωσης από τα κατώτερα αυχενικά ή ανώτερα οσφυϊκά μυελοτόμια στα κατώτερα ή ανώτερα θωρακικά επίπεδα) ή στους κοιλιακούς μύες. Όσον αφορά στις περιοχές της ΑΜΣΣ και ΟΜΣΣ, η παρουσία ΗΜΓ σημείων προσβολής του ΚΚΝ αρκεί να επιβεβαιωθεί σε τουλάχιστον 2 μύες που νευρώνονται από διαφορετικές ρίζες και νεύρα.

Οι μελέτες κινητικής και αισθητικής αγωγιμότητας χρησιμοποιούνται κυρίως για τον αποκλεισμό άλλων νοσολογικών οντοτήτων. Παρόμοια, επικουρικά λειτουργούν οι απεικονιστικές εξετάσεις και ο περαιτέρω εργαστηριακός έλεγχος (αιματολογικός ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό -ΕΝΥ-), προς αποκλεισμό νοσολογικών οντοτήτων που μπορεί να μιμούνται την ΝΚΝ.

Κριτήρια Awaji (14)

Τα κριτήρια Awaji επιβεβαίωσαν εκ νέου τη σημασία των θεμελιωδών αρχών των κριτηρίων El Escorial. Η καινοτομία των εν λόγω κριτηρίων έγκειται ουσιαστικά στα παρακάτω:

- στην εξίσωση της διαγνωστικής αξίας των κλινικών και ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων.
- Στην ενσωμάτωση των δεσμιδικών δυναμικών στα συμβατά ευρήματα ενεργούς απονεύρωσης (μαζί με ινιδικά δυναμικά και θετικά αιχμηρά κύματα) παρουσία σημείων χρόνιας απονεύρωσης, ιδιαίτερα όταν τα δεσμιδικά δυναμικά παρουσιάζουν σύνθετη μορφολογία.

Εκ των ανωτέρω, βάσει των κριτηρίων Awaji, η διάγνωση της νόσου απλοποιείται μερικώς και μπορεί να καθιερωθεί με 3 διαφορετικά επίπεδα βεβαιότητας:

- Κλινικά βέβαιη διάγνωση NKN: κλινικά ή ηλεκτροφυσιολογικά σημεία βλάβης AKN και KKN σε 3 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ (εγκεφαλικό στέλεχος + 2 εκ των 3 περιοχών της ΣΣ ή ταυτόχρονα στις 3 περιοχές της ΣΣ: ΑΜΣΣ-ΘΜΣΣ-ΟΜΣΣ)
- Κλινικά πιθανή διάγνωση NKN: κλινικά ή ηλεκτροφυσιολογικά σημεία προσβολής AKN και KKN σε 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ με κάποια σημεία προσβολής AKN άνωθεν των σημείων προσβολής του KKN.
- Κλινικά δυνατή διάγνωση NKN: κλινικά ή ηλεκτροφυσιολογικά σημεία προσβολής AKN και KKN σε 1 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ ή αποκλειστικά σημεία προσβολής AKN σε τουλάχιστον 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ ή σημεία προσβολής KKN άνωθεν των σημείων προσβολής του AKN.

Κριτήρια Gold Coast (18)

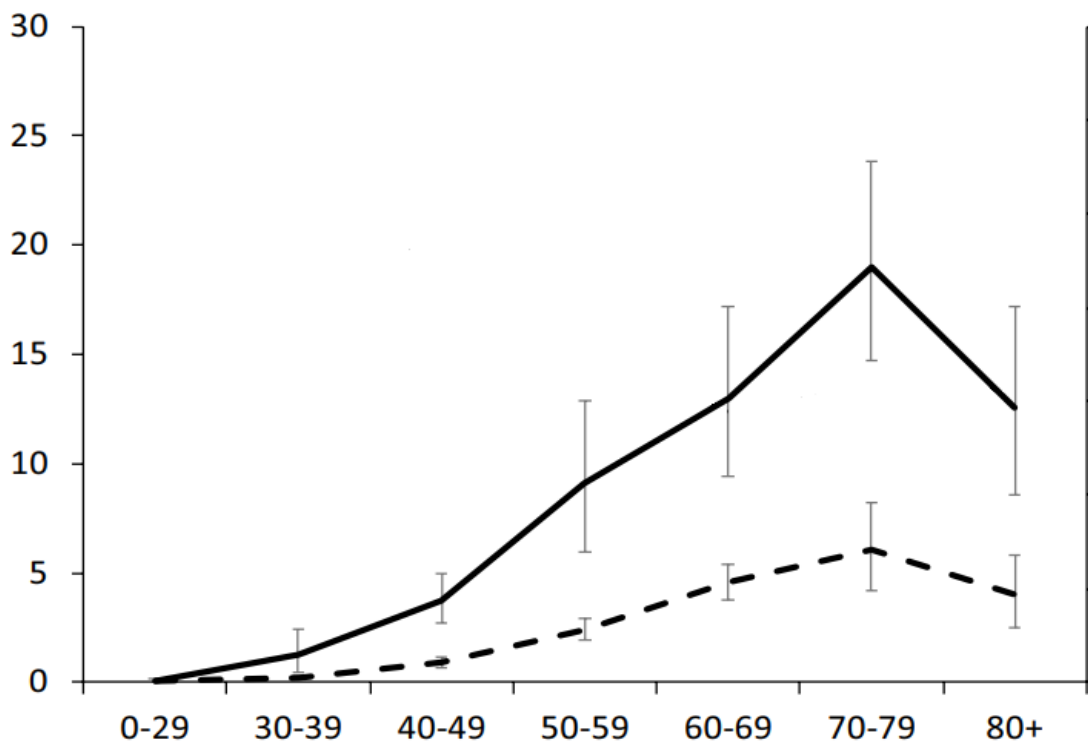
Παρακάτω συνοψίζονται οι θεμελιώδεις αρχές της διάγνωσης της NKN βάσει των κριτηρίων Gold Coast:

- Η NKN είναι μια προοδευτικά επιδεινούμενη διαταραχή του κινητικού συστήματος.
- Η κλινικά εστιακή έναρξη είναι συχνότερη, χωρίς όμως να αποκλείεται και πιο γενικευμένη συμπτωματολογία κατά την έναρξη.
- Η κινητική διαταραχή αφορά σε σημειολογία τόσο από τον AKN όσο και από τον KKN, αναγνωρίζεται όμως πως η πυραμιδική σημειολογία μπορεί να μην είναι πάντα κλινικά ξεκάθαρη.
- Σημεία προσβολής του KKN μπορεί να διαπιστωθούν είτε κλινικά ή ηλεκτροφυσιολογικά. Επικουρικά χρησιμοποιείται η υπερηχογραφική καταγραφή δεσμιδώσεων.
- Για διαγνωστικού σκοπούς, η σημειολογία προσβολής του AKN καθιερώνεται από την κλινική εξέταση.
- Η NKN μπορεί να συνοδεύεται από γνωστικά ελλείμματα, διαταραχές συμπεριφοράς και ψυχιατρικές εκδηλώσεις.

Η καινοτομία των εν λόγω κριτηρίων έγκειται ουσιαστικά στην απλοποίηση της διάγνωσης της NKN ως εξής: παρουσία σημείων προσβολής AKN και KKN σε τουλάχιστον 1 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ (στην ίδια περιοχή) ή παρουσία σημείων προσβολής KKN σε τουλάχιστον 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ, εφόσον πληρούνται οι θεμελιώδεις αρχές τις προοδευτικής επιδείνωσης (διαπιστωμένη είτε από το ιστορικό είτε από την κλινική εξέταση) και του αποκλεισμού εναλλακτικών διαγνώσεων (με τη χρήση επικουρικών εξετάσεων όπου κρίνεται σκόπιμο, πχ απεικονιστικός έλεγχος, εξέταση ENY, κτλ).

Επιδημιολογία

Ο αδρός (μη σταθμισμένος ως προς το φύλο και την ηλικία) επιπολασμός της NKN παγκοσμίως είναι περίπου 4.4 (3.9-5.0) περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα και η αδρή επίπτωση ανέρχεται κατά προσέγγιση στα 1.6 (1.4-1.8) νέα περιστατικά ανά 100.000 ανθρωπο-έτη (22). Οι άντρες (επίπτωση ~1.9, επιπολασμός ~6.0) φαίνεται να νοσούν συχνότερα σε σχέση με τις γυναίκες (επίπτωση ~1.4, επιπολασμός ~3.9), ενώ η συχνότητα της νόσου (επίπτωση και επιπολασμός) φαίνεται να αυξάνεται με την ηλικία και να κορυφώνεται την 8^η δεκαετία της ζωής (22). Παράλληλα, με την αύξηση της ηλικίας ελαττώνεται η αυξημένη αναλογία πασχόντων ανδρών, με οριακά πλήρη ισορροπία αρρένων-θηλέων πασχόντων στην ηλικιωμένη ζωή (23)



Εικόνα 6 Επιδημιολογία της NKN: η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στον επιπολασμό της νόσου και η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στην επίπτωση. Στον οριζόντιο άξονα καταγράφονται οι ηλικιακές ομάδες και στον αριστερό κάθετο άξονα ο επιπολασμός (απόλυτος αριθμός περιστατικών/100,000 πληθυσμού) και η επίπτωση (απόλυτος αριθμός περιστατικών/100,000 πληθυσμού ανά έτος).

Η συχνότητα της νόσου είναι σημαντικά μικρότερη στη νότια και ανατολική Ασία και υψηλότερη στη δυτική Ευρώπη και βόρεια Αμερική (22,24). Η νόσος είναι πλέον συνηθέστερη στις αναπτυγμένες χώρες, σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες (22). Μέχρι το 2040, προβλέπεται πως ο αριθμός των περιστατικών με NKN θα αυξηθεί κατά ~69% (από ~220.000 σε ~380.000), κυρίως λόγω της βελτίωσης της συνολικής επιβίωσης παράλληλα με τη γήρανση του παγκόσμιου πληθυσμού (ενδέχεται το συγκεκριμένο νούμερο να υποεκτιμά την πραγματικότητα λόγω της συνεχώς βελτιούμενης περίθαλψης και των προοδευτικά καλύτερων συνθηκών διαβίωσης) (25).

Παθοφυσιολογία

Το μεγάλο “αγκάθι” στην αποτελεσματική αντιμετώπιση της NKN παραμένει η ελλιπής κατανόηση των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που οδηγούν στη νόσηση. Προς το παρόν, ενώ αναγνωρίζεται ο κεντρικός ρόλος της δυσλειτουργίας των AKN και KKN στην παθογένεση της νόσου, το πρωταρχικό σύμβαμα που οδηγεί στον παθοφυσιολογικό καταρράκτη της νευροεκφύλισης των κινητικών νευρώνων δεν έχει καθοριστεί (26,27). Τα τρία επικρατέστερα θεωρητικά μοντέλα είναι τα παρακάτω:

- The dying-forward hypothesis (28): η πρωταρχική διαταραχή λαμβάνει χώρα σε φλοιικό επίπεδο και η εκφύλιση του KKN πυροδοτείται στην πορεία μέσω συναπτικών μηχανισμών διεγερτικής τοξικότητας, πχ γλουταμινεργικών (excitotoxicity).
- The dying-back hypothesis (29,30): το πρωταρχικό σύμβαμα είναι η δυσλειτουργία του KKN και λόγω έλλειψης ειδικών νευροτροφικών παραγόντων που φυσιολογικά απελευθερώνονται στη νευρομυϊκή σύναψη και μεταφέρονται ανάδρομα στο κυτταρικό σώμα επισυμβαίνει η δυσλειτουργία του AKN.
- The independent neurodegeneration hypothesis: σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η εκφύλιση των AKN διαδράμει ανεξάρτητα από την εκφύλιση των KKN (31).

Ασχέτως του πρωταρχικού παθογενετικού γεγονότος, είναι γενικά αποδεκτό πως οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη νευροεκφύλιση είναι πολλαπλοί (26,32). Ανάμεσα σε αυτούς, έχει διαπιστωθεί δυσλειτουργία των αστροκυττάρων με μειωμένη “κάθαρση” του γλουταμικού από τη συναπτική σχισμή που τελικά οδηγεί σε νευροεκφύλιση μέσω της παραγωγής ελεύθερων τοξικών ριζών οξυγόνου (O₂) και της αυξημένης εισροής κατιόντων ασβεστίου (Ca²⁺) που προάγουν την ενεργοποίηση Ca²⁺ εξαρτώμενων ενζυμικών μονοπατιών. Επιπλέον, μεταλλάξεις στα γονίδια c9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72), TDP-43 (TAR DNA-Binding Protein 43) και FUS (fused in sarcoma) οδηγούν σε απορρύθμιση του μεταβολισμού του RNA και τελικά σε σχηματισμό ενδοκυττάρων εναποθέσεων που παραβλάπτουν τους νευρώνες. Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα SOD-1 (superoxide dismutase 1) εμπλέκονται μέσω της αύξησης του οξειδωτικού στρες, της επαγωγής μιτοχondριακής δυσλειτουργίας (μεταβολικό στρες), του σχηματισμού ενδοκυττάρων εναποθέσεων, της συσσώρευσης νευροϊνιδίων και της διαταραχής των διαδικασιών αξονικής μεταφοράς-διακίνησης. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ενεργοποίηση της μικρογλοίας με επακόλουθη παραγωγή και αυξημένη έκκριση προφλεγμονοδών κυτταροκινών που προάγουν περαιτέρω τη νευροεκφύλιση.

Ιστοπαθολογία

Όλες οι μορφές NKN σχετίζονται με κυτταροπλασματικά έγκλειστα ουβικουιτίνης (ubiquitin) στους εκφυλιζόμενους κινητικούς νευρώνες (33). Με ορισμένες εξαιρέσεις, αυτά τα έγκλειστα ουβικουιτίνης περιλαμβάνουν TDP-43, p62 και άλλες πρωτεΐνες (34). Αντίθετα, σε ασθενείς με παθογενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου SOD-1, τα έγκλειστα ουβικουιτίνης περιλαμβάνουν συσσωρεύσεις πρωτεΐνης SOD-1 και όχι TDP-43 (35). Σημειώνεται πως παθολογικά έγκλειστα με πρωτεΐνη SOD-1 δεν διαπιστώνονται σε περιπτώσεις σποραδικού NKN (35). Παρομοίως, σε ασθενείς με παθογενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου FUS, τα

έγκλειστα ουβικουιτίνης περιλαμβάνουν συσσωρεύσεις μεταλλαγμένης πρωτεΐνης FUS και όχι TDP-43, παρόλο που περιγράφονται και περιπτώσεις στις οποίες συνυπάρχουν συσσωρεύσεις πρωτεΐνης FUS και TDP-43 (36).

Γενετική αρχιτεκτονική της νόσου κινητικού νευρώνα

Παρόλο που στην πλειοψηφία τους οι περιπτώσεις ασθενών με NKN είναι σποραδικές, ένα 10% του συνόλου των περιπτώσεων πάσχει από οικογενή NKN, δηλαδή η νόσος ακολουθεί τους νόμους της μενδελικής κληρονομικότητας (37). Σημειώνεται πως στο υπόλοιπο 90% ενώ υπεισέρχεται πλειάδα περιβαλλοντικών παραγόντων, η κληρονομικότητα αποτελεί και πάλι έναν ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα με περίπου 50% της μεταβλητότητας της νόσου να εξηγείται γενετικά (παρόλο που μέχρι σήμερα έχει ανακαλυφθεί περίπου το 10% της γενετικής βάσης της NKN) (38,39).

Η διερεύνηση της γενετικής αρχιτεκτονικής της NKN (όπως και κάθε νόσου) βασίζεται σε 5 κύριους τύπους μελετών: linkage analysis (μελέτη σύνδεσης), candidate gene analysis (μελέτη συσχέτισης υποψήφιου γονιδίου), genome-wide association studies (GWASs – μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος), whole-exome sequencing (WES – αλληλούχιση όλων των περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή αλλιώς των εξονίων), και whole-genome sequencing (WGS – αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος). Κάθε τύπος μελέτης παρουσιάζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και η επιλογή του ενδείκνυται για την απάντηση ξεχωριστών γενετικών ερωτημάτων.

Linkage Studies

Επικεντρώνονται στη διερεύνηση της μετάδοσης ενός χαρακτηριστικού-ασθένειας καθώς επίσης και του αντίστοιχου γονιδιακού τόπου μεταξύ των ατόμων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια (40). Αποτελεί μια κλασική προσέγγιση, η οποία αποδείχθηκε ικανή να ταυτοποιήσει παθογενετικούς γονιδιακούς πολυμορφισμούς στο 50% των περιπτώσεων NKN

με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό και στο 10-20% των σποραδικών περιπτώσεων NKN (41). Το πρώτο γονίδιο που αποκαλύφθηκε από τις μελέτες σύνδεσης και επιβεβαίωσε την παρουσία περιπτώσεων NKN που ακολουθούν τις αρχές της μενδελικής κληρονομικότητας ήταν το SOD1 (superoxide dismutase 1- υπεροξειδική δισμουτάση 1), το 1993 (42). Στην πορεία, οι μελέτες σύνδεσης ανέδειξαν παθογενετικούς γονιδιακούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο TAR DNA binding protein (TARDBN) που κωδικοποιεί την TAR DNA binding protein 43 (TDP-43), στο γονίδιο της FUS RNA binding protein (FUS) και στο γονίδιο C9orf72 (37). Συνολικά, τα τέσσερα αυτά γονίδια αποτελούν τα πλέον καλά καθορισμένα γονίδια που εμπλέκονται αιτιολογικά στην οικογενή NKN, και οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις αυτών συνιστούν την ιστοπαθολογική “σφραγίδα” της νόσου (43).

SOD-1 (44–46)

Αφορά σε 10-20% των περιπτώσεων με οικογενή NKN και εμπλέκεται σε ~1% των περιπτώσεων με σποραδική NKN. Αρχικά θεωρήθηκε ότι συνεισφέρει στη νόσο μέσω της ελαττωμένης ικανότητας διαχείρισης των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου. Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι ο παθολογικός αντίκτυπος των SOD-1 μεταλλάξεων οφείλεται στην αστάθεια και ακολούθως παθολογική αναδίπλωση της πρωτεΐνης SOD-1 που παραβλάπτει τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

TARDBN (47–49)

Αφορά σε ~5% των περιπτώσεων με οικογενή NKN και εμπλέκεται σε ~1% των περιπτώσεων με σποραδική NKN. Φυσιολογικά εντοπίζεται στον πυρήνα, αλλά σε περιπτώσεις ασθενών με NKN μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί αδιάλυτα συσσωματώματα που παραβλάπτουν τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Παράλληλα, η κυτταροπλασματική ανακατανομή της TDP-43 εμποδίζει την εξυπηρέτηση της φυσιολογικής της λειτουργίας που έγκειται στη ρύθμιση του ματίσματος του mRNA (αγγελιοφόρου RNA).

FUS (50–52)

Παρομοίως με το TARDBN, μεταλλάξεις στο γονίδιο FUS σχετίζονται με ~5% των περιπτώσεων με οικογενή NKN και ~1% των περιπτώσεων με σποραδική NKN. Παράλληλα, ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη FUS εμπλέκεται στην νόσο, προσομοιάζει αυτόν της πρωτεΐνης TDP-43: ενώ φυσιολογικά εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα και υπεισέρχεται στον μεταβολισμό του RNA και στην επιδιόρθωση του DNA, σε περιπτώσεις ασθενών με NKN μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί αδιάλυτα συσσωματώματα που παραβιάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

C9orf72 (53–55)

Πρόκειται για μία μετάλλαξη που απαντάται αρκετά συχνά σε ταυτόχρονη νόσηση από NKN και μετωποκροταφική άνοια (ΜΚΑ). Αφορά σε >20% των περιπτώσεων με οικογενή NKN και ~5% των περιπτώσεων με σποραδική NKN. Εικάζεται πως ευοδώνει τη νευροεκφύλιση μέσω της απώλειας της φυσιολογικής πρωτεϊνικής λειτουργίας (η οποία δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη) και της συσσώρευσης τοξικών πρωτεϊνικών εναποθέσεων (TDP-43, p62, κ.α.).

Candidate gene analysis (56–58)

Σε ορισμένες μελέτες διερευνώνται επιλεκτικά υποψήφια γονίδια τα οποία εικάζεται πως εμπλέκονται στη NKN με βάση την ομοιότητα-συσχέτιση αυτών με γονίδια που έχουν ήδη συσχετιστεί με τη νόσο ή με βάση τον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου. Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή. Η χρήση της ενδείκνυται για την διερεύνηση συγκεκριμένων παθογενετικών υποθέσεων και την επιβεβαίωση ευρημάτων άλλου τύπου μελετών.

Genome-wide association studies (GWASs) (59–62)

Πρόκειται για μελέτες συσχέτισης πολλαπλών γονιδιακών τόπων σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Παρουσιάζουν το ξεκάθαρο πλεονέκτημα της ταυτόχρονης αναζήτησης πολλαπλών πολυμορφισμών σε σποραδικές περιπτώσεις της νόσου και συχνά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (linkage or candidate gene analysis). Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται οι μεγάλες απαιτήσεις ως προς το μέγεθος του δείγματος, ιδιαίτερα στη διερεύνηση σπάνιων αλληλίων και αλληλομόρων με χαμηλό μέγεθος συσχέτισης (effect size) με τη νόσο, και παράλληλα ως προς την ομοιογενή σύνθεση του δείγματος (σε σπάνιες νόσους με χαμηλό επιπολασμό, η δημιουργία ενός αρκετά μεγάλου ομοιογενούς δείγματος είναι σχεδόν ακατόρθωτη), ενώ δεν καθιερώνουν την αιτιολογική συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς και την νόσο (απαιτούνται επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί εάν οι πολυμορφισμοί συνεισφέρουν στην παθολογία της νόσου). Από τις GWASs έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί σημαντικοί πολυμορφισμοί που συνεισφέρουν αυξημένο κίνδυνο για σποραδική NKN, συμπεριλαμβανομένων των ACSL5, MOB1, DPP6, SCFD1, και άλλων.

Whole-exome sequencing (WES) & Whole-genome sequencing (WGS) (63–65)

Πρόκειται για μελέτες αλληλούχισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των εξονίων (περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες) και του πλήρους γονιδιώματος αντίστοιχα. Σημειώνεται πως το σύνολο των εξονίων καταλαμβάνει περίπου το 1% του DNA, ενώ το 99% του DNA αφορά σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές. Συλλογικά, οι ανωτέρω διαδικασίες αποκαλούνται και Next-generation sequencing (αλληλούχιση νέας γενιάς). Διαθέτουν το πλεονέκτημα ανάδειξης νέων γονιδιακών τόπων στην παθογένεση της νόσου. Παρόλα αυτά, πέραν του αυξημένου κόστους, υπεισέρχονται ζητήματα ιατρικής ηθικής, ενώ το αναλυτικό κομμάτι των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δαιδαλώδες.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν την προδιάθεση για NKN

Ο ακριβής ρόλος των περιβαλλοντικών παραγόντων στη NKN είναι λιγότερο σαφής από αυτόν των γενετικών καθοριστών της νόσου. Οι επικρατούσες θεωρίες παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ετερογένεια με ορισμένους συγγραφείς να υποστηρίζουν πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ασκούν ελάχιστη επίδραση, άλλους να διατείνονται πως έχουν εξόχως σημαντικό ρόλο, και κάποιους να θεωρούν πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ασκούν επίδραση μόνο σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα (66).

Ανάμεσα στην πληθώρα παραγόντων που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη NKN, ιδιαίτερη μνεία αξίζει στα βαρέα μέταλλα και τα παρασιτοκτόνα σκευάσματα (67,68). Πλήθος μελετών έχουν αναδείξει τον αυξημένο κίνδυνο νόσησης από NKN σε άτομα με εργασιακή έκθεση σε μόλυβδο, ενώ αρκετές έχουν επιβεβαιώσει τα αυξημένα επίπεδα μόλυβδου στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς των ασθενών σε NKN σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (69,70). Παράλληλα λιγότερο καταληκτικά δεδομένα συνηγορούν πως και άλλα βαρέα μέταλλα καθώς επίσης και ιχνοστοιχεία δύναται να σχετίζονται με προδιάθεση για NKN (67,71). Όσον αφορά στα παρασιτοκτόνα, πλήθος σχετικών σκευασμάτων έχουν ενοχοποιηθεί πως προδιαθέτουν για την ανάπτυξη NKN, και η λίστα αυτών τείνει να αυξάνεται συνεχώς (72,73).

Άλλες περιβαλλοντικές εκθέσεις που έχει φανεί πως πιθανώς να αυξάνουν τον κίνδυνο νόσησης είναι η στρατιωτική υπηρεσία και τα επαγγέλματα με σημαντικές σωματικές απαιτήσεις (74,75), οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις ιδιαίτερα στα πλαίσια ανταγωνιστικών αθλημάτων - επαγγελματικού αθλητισμού (76,77), ο χαμηλός δείκτης μάζας σώματος και η ελαττωμένη θερμιδική πρόσληψη (78,79), η επαγγελματική έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία (πχ ηλεκτρολόγος) (80–82) και το κάπνισμα (75,83) (σκοπίμως παραλείπεται ένας μεγάλος αριθμός εκθέσεων που δεν έχουν παρά περιστασιακά συσχετιστεί με τη νόσο).

Πίνακας 1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με ΝΚΝ

Βαρέα μέταλλα και ιχνοστοιχεία	Μόλυβδος, Υδράργυρος, Μαγγάνιο, Σελήνιο, κ.α.
Παρασιτοκτόνα	Ζιζανιοκτόνα, Υποκαπνιστικά, Πυρεθροειδή, Οργανοχλωρικά εντομοκτόνα, κ.α.
Διαιτητικοί παράγοντες	Χαμηλός δείκτης μάζας σώματος (BMI index), Μειωμένη θερμιδική πρόσληψη
Άλλες επαγγελματικές εκθέσεις	Στρατιωτική υπηρεσία, Επαγγέλματα με σημαντικές σωματικές απαιτήσεις, Επαγγελματικός - ανταγωνιστικός αθλητισμός, Επαγγελματική έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία
Κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις	
Κάπνισμα	

Κλινική εικόνα

Κινητικά συμπτώματα

Παρόλο που τα χαρακτηριστικά της προσβολής του ΑΚΝ και ΚΚΝ (βλέπε παραπάνω) αναγνωρίζονται εύκολα από τον κλινικό ιατρό, η ΝΚΝ χαρακτηρίζεται από ετερογένεια στην παρουσίαση και εξέλιξη της. Συχνότερα περιγράφεται εστιακή έναρξη, συνήθως στα άκρα και λιγότερα συχνά στους προμηκικούς ή αναπνευστικούς μύες, ενώ σε συχνότητα ακολουθεί η πολυεστιακή έναρξη της νόσου (84,85). Η προσβολή των μυών του κορμού είναι εξαιρετικά σπάνια στα πρώιμα στάδια της νόσου.

Η εξάπλωση της σημειολογίας φαίνεται να ακολουθεί σχετικά σταθερά μοτίβα, με τη συμπτωματολογία αρχικά να εμφανίζεται στο αντίπλευρο υγιές άκρο (πχ από το αριστερό άνω στο δεξιό άνω άκρο) και λιγότερο συχνά στο ομόπλευρο υγιές άκρο (πχ από το αριστερό άνω

στο αριστερό κάτω άκρο) (84,86). Παράλληλα, οι ασθενείς με προμηκική σημειολογία συνήθως εμφανίζουν νωρίτερα συμπτώματα από τα άνω κι έπειτα από τα κάτω άκρα (84).

Αδρά, περιγράφονται οι παρακάτω “καλά καθορισμένες” φαινοτυπικές εικόνες της νόσου: παρόλα αυτά η έναρξη και κλινική εξέλιξη μπορεί να μην εμπίπτει επακριβώς σε κάποια από τις παρακάτω κατηγορίες (87):

- 1) Κλασικός φαινότυπος (γνωστός και ως φαινότυπος Charcot): χαρακτηρίζεται από έναρξη στα άνω ή κάτω άκρα, με ξεκάθαρη παρουσία σημείων προσβολής από τους ΑΚΝ και ΚΚΝ (88).
- 2) Προμηκικός φαινότυπος: χαρακτηρίζεται από έναρξη με δυσαρθρία ή δυσκαταποσία, ατροφία και δεσμιδώσεις του μυός της γλώσσας και απουσία νωτιαίας σημειολογίας κατά τους πρώτους (συνήθως 6) μήνες μετά την έναρξη. Τα πυραμιδικά σημεία μπορεί επίσης να μην είναι ξεκάθαρα κατά τους πρώτους (συνήθως 6) μήνες από την έναρξη της νόσου (88).
- 3) Σύνδρομο άνω ή κάτω άκρου: συνήθως χαρακτηρίζεται από κυρίαρχη σημειολογία προσβολής ΚΚΝ στους μύες ενός άνω άκρου (συχνότερα εγγύς) ή στους μύες ενός κάτω άκρου (συχνότερα άπω) για 12 μήνες από την έναρξη της νόσου. Η πυραμιδική σημειολογία τείνει να είναι ηπιότερη (89).
- 4) ΝΚΝ με κυρίαρχη συμμετοχή του ΑΚΝ: χαρακτηρίζεται από υπεροχή της πυραμιδικής σημειολογίας με ηπιότερα αλλά παρόντα σημεία προσβολής ΚΚΝ από την έναρξη της νόσου (90).
- 5) Αναπνευστικός φαινότυπος: χαρακτηρίζεται από κυρίαρχη συμπτωματολογία από τους αναπνευστικούς μύες (δύσπνοια, ορθόπνοια, εύκολη κόπωση, κτλ) από την έναρξη της νόσου με ήπια προμηκικά και νωτιαία σημεία και συμπτώματα κατά τους πρώτους (συνήθως 6) μήνες (91).

Ο προμηκικός φαινότυπος γίνεται συχνότερος όσο αυξάνεται η ηλικία εισβολής, με τους υπερήλικες να παρουσιάζουν πενταπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν την εν λόγω κλινική εικόνα σε σχέση με τους μεσήλικες (88). Παρομοίως, ο αναπνευστικός φαινότυπος τείνει να είναι συχνότερος σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας ενώ προσβάλλει περισσότερο άντρες παρά γυναίκες (87). Ο κλασικός και ο φαινότυπος με κυρίαρχη συμμετοχή του AKN είναι αντίθετα συχνότεροι σε άτομα νεαρότερης ηλικίας (90). Τέλος το σύνδρομο άνω άκρου προσβάλλει επίσης νεότερους, συνήθως άρρενες ασθενείς, ενώ το σύνδρομο κάτω άκρου δε φαίνεται να σχετίζεται με τις παραμέτρους της ηλικίας και του φύλου (87).

Σημειώνεται πως ενώ κάθε γονότυπος μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση καθενός από τους ανωτέρω φαινοτύπους, οι παρακάτω συσχετίσεις έχουν διαπιστωθεί: μεταλλάξεις (επέκταση) του γονιδίου C9orf72 συνδέονται σχετικά συχνότερα με τον προμηκικό και σπανιότερα με τον φαινότυπο με κυρίαρχη συμμετοχή του AKN. Μεταλλάξεις του SOD-1 γονιδίου διαπιστώνονται με σχετικά μεγαλύτερη συχνότητα σε σύνδρομο κάτω άκρου και σπανιότερα σε ασθενείς με προμηκικό φαινότυπο. Μεταλλάξεις του γονιδίου TARDBP συνδέονται σχετικά συχνότερα με τον φαινότυπο με κυρίαρχη συμμετοχή του AKN και, τέλος, μεταλλάξεις του γονιδίου FUS δεν παρουσιάζουν φαινοτυπικές συσχετίσεις (87).

Όσον αφορά στην επιβίωση, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο αναπνευστικός και προμηκικός φαινότυπος έχουν την χειρότερη πρόγνωση, ενώ ο φαινότυπος με κυρίαρχη συμμετοχή του AKN πιθανώς παρουσιάζει την μεγαλύτερη επιβίωση (88). Παρά τις ανωτέρω παρατηρήσεις πρέπει να σημειωθεί πως ανεξαρτήτως φαινοτύπου, έχει διαπιστωθεί μεγάλη ετερογένεια στην επιβίωση των ασθενών με NKN και δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι παράγοντες που την επηρεάζουν.

Μη κινητικά συμπτώματα

Παρά την κυρίαρχη παρουσία κινητικών σημείων και συμπτωμάτων, οι ασθενείς με ΝΚΝ παρουσιάζουν μία πλειάδα μη κινητικών εκδηλώσεων (92). Ίσως τα περισσότερο μελετημένα μη κινητικά συμπτώματα σε ΝΚΝ να είναι αυτά της γνωσιακής έκπτωσης και των νευροψυχιατρικών διαταραχών (93). Είναι πλέον γνωστό πως η ΝΚΝ συνοδεύεται σε άνω του 50% των περιπτώσεων από γνωσιακά-νευροψυχολογικά ελλείμματα και συμπεριφορικές-νευροψυχιατρικές διαταραχές (94). Συχνά οι ανωτέρω διαταραχές συνυπάρχουν ενώ σε ποσοστά 15-20% διαγιγνώσκεται συνυπάρχουσα ΜΚΑ (93,95). Στην πράξη, συχνά οι ασθενείς με ΝΚΝ κατηγοριοποιούνται βάσει της παρακάτω ταξινόμησης με γνώμονα τα ανωτέρω συμπτώματα (94): 1) ΝΚΝ με γνωσιακή έκπτωση, 2) ΝΚΝ με συμπεριφορικές διαταραχές, 3) ΝΚΝ με συνδυασμό γνωσιακής έκπτωσης και συμπεριφορικών διαταραχών, 4) ΝΚΝ με ΜΚΑ.

Εκ των γνωσιακών ελλειμάτων, ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι η εκτελεστική δυσλειτουργία και η διαταραγμένη λεκτική ευχέρεια (αμφότεροι, δείκτες μετωπιαίας δυσλειτουργίας κυρίως στην προμετωπιαία περιοχή) ενώ λιγότερο εκσεσημασμένες διαταραχές μπορεί να αφορούν και στους λοιπούς γνωσιακούς τομείς (πχ προσοχή, μνήμη) (94,96,97).

Εκ των συμπεριφορικών διαταραχών, η απάθεια φαίνεται να είναι το πλέον αναγνωρίσιμο σύμπτωμα σε άτομα με ΝΚΝ (μέχρι και 70% των πασχόντων, νευροανατομικό ισοδύναμο της απάθειας θεωρείται επίσης η μετωπιαία δυσλειτουργία) και ακολουθούν η διαταραχές του συναισθήματος, ενώ δεν αποκλείεται να είναι παρόν οποιοδήποτε νευροψυχιατρικό σύμπτωμα (πχ άρση αναστολών, ευερεθιστότητα, ευφορία, διαταραχές όρεξης-διατροφικών επιλογών, ψυχωτικά συμπτώματα) (98–100).

Παράλληλα, μία πλειάδα μη κινητικών, μη γνωσιακών-συμπεριφορικών συμπτωμάτων μπορεί να παρουσιαστούν από τα πρώιμα στάδια της νόσου (Πίνακας 2) (92,101–104).

Σημειώνεται πως παρά τη επικρατούσα θεωρία πως η ΝΚΝ είναι περιορισμένη αποκλειστικά στους ΚΝ, ορισμένοι ασθενείς αιτιώνται αισθητικά συμπτώματα, συχνότερα αιμωδίες (δεν υπάρχει ιδιαίτερη βιβλιογραφία που να υποστηρίζει με νευροφυσιολογικά ευρήματα τις εν λόγω αιτιάσεις) και διαταραχές αυτονόμου, ενώ σε ορισμένες γενετικά καθορισμένες περιπτώσεις ασθενών με ΝΚΝ μπορεί να συνυπάρχει παρκινσονισμός ή παρεγκεφαλιδική αταξία (105).

Πίνακας 2 Μη κινητικά συμπτώματα σε ΝΚΝ

Νευροψυχιατρικά	Απάθεια, Κατάθλιψη, Ανησυχία, Αυτοκτονικός ιδεασμός, Απρόσφορο συναίσθημα, Διαταραχές συμπεριφοράς, Διαταραχές όρεξης και διατροφικών επιλογών, Ψυχωτικά συμπτώματα, κ.α.
Γνωσιακά	Μετωποκροταφική άνοια, Εκτελεστική δυσλειτουργία, Διαταραχή λεκτικής ευχέρειας, Γλωσσική δυσλειτουργία, κ.α.
Αισθητικά	Υποσμία, Υπογευσία, Αιμωδίες
Διαταραχές ύπνου	Δυσκολία στην επέλευση και διατήρηση του ύπνου, Φτωχή ποιότητα ύπνου, Υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας
Αίσθημα κόπωσης	
Πόνος	
Από το αυτόνομο	Διαταραχή εφίδρωσης, Ορθοστατική υπόταση, Μικρότερη διακύμανση καρδιακού ρυθμού
Από το πεπτικό	Δυσφαγία – απώλεια βάρους, Δυσκοιλιότητα, Ακράτεια κοπράνων, Σιελόρροια, Ξηροστομία
Από το ουροποιητικό	Ακράτεια ούρων, νυχτουρία
Από το καρδιαγγειακό	Αρτηριακή υπέρταση, Αυξημένος καρδιακός ρυθμός στην ηρεμία, Οιδήματα εξαρτημένων περιοχών ή και ανά σάρκα

Αντιμετώπιση

Θεραπείες που επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου

Επί του παρόντος δεν υπάρχει καμία διαθέσιμη θεραπεία η οποία να αναστρέφει ή να αναστέλλει την πρόοδο της NKN. Στις περισσότερες χώρες η θεραπεία με ριλουζόλη έχει εγκριθεί για την επιβράδυνση της εξέλιξης της NKN (106). Ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην επιβράδυνση της εξέλιξης αφορά στην παρεμπόδιση της γλουταμινεργικής νευροδιαβίβασης στο ΚΝΣ (107). Τα δεδομένα που υποστηρίζουν τη χορήγηση ριλουζόλης προέρχονται από τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές (108–110). Έχει φανεί πως η συστηματική της χορήγηση (100mg ημερησίως από την στιγμή που ταυτοποιείται η νόσος) παρατείνει την ελεύθερη τραχειοστομίας επιβίωση κατά 2-3 μήνες. Παράλληλα, η συστηματική χορήγηση ριλουζόλης δεν σχετίζεται με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες.

Πιο πρόσφατα, ο Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη χορήγηση ενός αντιοξειδωτικού σκευάσματος, της ενταραβόνης (111). Το εν λόγω σκεύασμα δεν έχει λάβει ακόμα την έγκριση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA). Δεδομένα από τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές έδειξαν πως η χορήγηση της ενταραβόνης είναι καλά ανεκτή και φαίνεται να επιβραδύνει την εξέλιξη των συμπτωμάτων στα πρώιμα στάδια της νόσου, χωρίς να διαπιστώνεται κάποιο επιπλέον όφελος όσον αφορά στην επιβίωση (112–114). Παρόλα αυτά, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η θέση του εν λόγω σκευάσματος στη θεραπεία της νόσου.

Πλην των ανωτέρω δραστικών ουσιών, καμία άλλη θεραπεία δεν έχει αποδεδειγμένα όφελος σε ασθενείς με ALS. Ένας μεγάλος αριθμός θεραπευτικών προσεγγίσεων βρίσκεται επί του παρόντος υπό έρευνα, μεταξύ των οποίων: μελετάται η ενδεχόμενη αποτελεσματικότητα παλαιών σκευασμάτων με διαφορετική ένδειξη (πχ μασιτινίμπη), αναπτύσσονται γονιδιακές θεραπείες για ασθενείς με SOD-1, C9orf73, FUS και άλλες μεταλλάξεις, αναγεννητικές θεραπείες βασισμένες σε βλαστοκύτταρα με σκοπό την αντικατάσταση των εκφυλιζόμενων

νευρώνων, μονοκλωνικά αντισώματα που κατευθύνονται προς τη μικρογλοία και άλλους στόχους που εμπλέκονται στην επαγωγή και την εξέλιξη των φλεγμονωδών διεργασιών του ΚΝΣ και θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στη μειωμένη παραγωγή ή αυξημένη κάθαρση των παθολογικών, κυτταροπλασματικών, πρωτεϊνικών εναποθέσεων, πχ SOD-1 ή TDP-43 (115).

Πίνακας 3 Υποστηρικτική - συμπτωματική θεραπεία ασθενών με ΝΚΝ

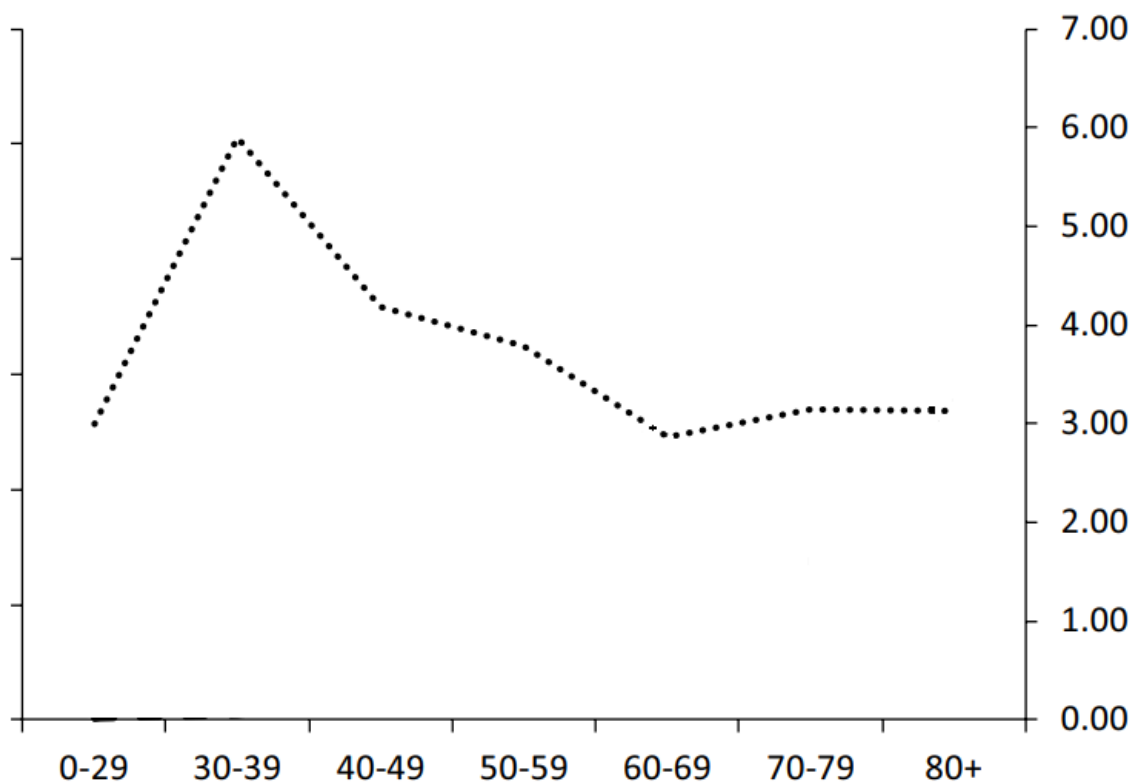
Σύμπτωμα	Θεραπεία
Επώδυνες μυϊκές συσπάσεις	Λεβετιρακετάμη, Μεξιλετίνη, Γκαμπαπεντίνη, Φυσικοθεραπεία
Σπαστικότητα	Μπακλοφαίνη, Τιζανιδίνη, Βενζοδιαζεπίνες – Αντλία μπακλοφαίνης
Πόνος	WHO analgesic ladder (116)
Κατάθλιψη	Εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs)
Ανησυχία	Βενζοδιαζεπίνες
Απρόσφορο συναίσθημα	SSRIs, Αμιτριπυλίνη, Δεξτρομεθορφάνη-κινιδίνη
Αίσθημα αδυναμίας-κόπωσης	Μοδαφινίλη, Ελεγχόμενη φυσική δραστηριότητα
Ξηροστομία	Σπρέι τεχνητού σιέλου, Πίλοκαρπίνη
Σιελόρροια	Ατροπίνη, Υοσκίνη, Αμιτριπυλίνη – Αλλαντική τοξίνη
Εκκρίσεις αναπνευστικού	Νεφελοποίηση με φυσιολογικό ορό – Καρβοκυστεΐνη
Δυσκαταποσία-πνιγμονή	Γαστροστομία (συνίσταται πρώιμη τοποθέτηση, πχ μετά την απώλεια 5% του βάρους)
Αναπνευστική ανεπάρκεια	Μη επεμβατικός αερισμός – επεμβατικός αερισμός μέσω τραχειοστομίας

Υποστηρικτική-συμπτωματική θεραπεία

Κάθε θεραπευτικό πλάνο ασθενούς με ΝΚΝ οφείλει να στοχεύει στην βελτιστοποίηση της ποιότητας ζωής και στην ελαχιστοποίηση των επιπλοκών της νόσου (117). Γενικά συνιστάται η οργάνωση πολύ-επιστημονικών ομάδων που να απαρτίζονται από ειδικούς οι οποίοι μπορούν να παρέχουν ολιστική φροντίδα στον ασθενή με ΝΚΝ.

Για τα περισσότερα συμπτώματα δεν υπάρχουν δεδομένα που να προκύπτουν από μελέτες οι οποίες επικεντρώνονται σε ασθενείς με ΝΚΝ, αλλά ακολουθούνται οι γενικές αρχές της συμπτωματικής θεραπείας (Πίνακας 2) (117,118).

Πρόγνωση



Εικόνα 8 Μέση επιβίωση ασθενών με ΝΚΝ:·. Στον οριζόντιο άξονα καταγράφονται οι ηλικιακές ομάδες, και στον δεξιό κάθετο άξονα (0.00-7.00) ο μέσος χρόνος επιβίωσης σε έτη.

Η ΝΚΝ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα δυσμενή πρόγνωση με μία μέση επιβίωση που υπολογίζεται περί τα 3 έτη από την έναρξη των συμπτωμάτων (ακόμη λιγότερο από τη στιγμή της διάγνωσης - επιβεβαίωσης) (119,120). Ένα μεγάλος αριθμός παραγόντων έχουν μελετηθεί ως προς την προγνωστική τους αξία για διάφορες εκβάσεις της νόσου και κυρίως για την επιβίωση (σημειώνεται πως συχνά εξισώνονται οι εκβάσεις “χρόνος μέχρι το θάνατο” και “χρόνος μέχρι την τραχειοστομία”) (121).

Εκ των πλέον αναγνωρισμένων καθοριστών της επιβίωσης, είναι η ηλικία, με τη νόσο να διαδράμει πιο επιθετικά (μικρότερη επιβίωση) όσο αυξάνεται η ηλικία του ασθενούς, ενώ το φύλο φαίνεται να μη σχετίζεται διαφορικά με την επιβίωση (122). Ανάμεσα στους τροποποιήσιμους παράγοντες που μειώνουν την επιβίωση ξεχωρίζει το κάπνισμα (σύγχρονος καπνιστής > πρώην καπνιστής > χωρίς ιστορικό καπνίσματος) και η συνολική κατάσταση της θρέψης, τόσο κατά το προνοσηρό στάδιο όσο και μετά την καθιέρωση της διάγνωσης (χαμηλός δείκτης μάζας-σώματος και κακή θρέψη προοικονομούν μικρότερη επιβίωση) (122,123).

Εκ των κλινικών παραγόντων, κακοί προγνωστικοί δείκτες αποτελούν ο αναπνευστικός και προμηκικός φαινότυπος της νόσου, η πρωιμότερη συμμετοχή του αναπνευστικού ανεξαρτήτως φαινοτύπου, η σοβαρότερη συμπτωματολογία κατά την εισβολή της νόσου, η ταχύτερη εξέλιξη στα πρώιμα στάδια, και η παρουσία γνωσιακών ή νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων και ιδιαίτερα ΜΚΑ (122,124,125). Παράλληλα, ένα διαρκώς εξελισσόμενο πεδίο στη σχετική έρευνα, αφορά στην ανάπτυξη βιοδεικτών για την πρόγνωση της νόσου. Επί του παρόντος, τα νευροϊνίδια ελαφράς ή βαριάς αλύσου στον ορό και πολύ περισσότερο στο ΕΝΥ των ασθενών με ΝΚΝ φαίνεται να σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη συνολική επιβίωση (126,127).

Διαφορική Διάγνωση και Παραλλαγές

Η διάγνωση της NKN πρέπει να καθιερωθεί με βεβαιότητα και εφόσον έχουν αποκλειστεί οι οντότητες που μπορεί να μιμούνται τη νόσο (μιμητές). Λαμβάνοντας υπόψη τον αντίκτυπο της διάγνωσης στα πλαίσια της πτωχότατης πρόγνωσης της νόσου, είναι απαραίτητο πριν γνωστοποιηθεί στον ασθενή η υποψία (ή διάγνωση) της NKN να προηγηθεί μια ενδεδειγμένη διερεύνηση με ιδιαίτερη έμφαση στις εν δυνάμει θεραπεύσιμες παθήσεις. Παράλληλα, είναι φρόνιμο να μην αποκλείεται η διάγνωση της νόσου σε ασθενείς με αυξημένη κλινική υποψία, οι οποίοι κατά την παρούσα εξέταση δεν πληρούν τα διαγνωστικά της νόσου κριτήρια. Παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο στην καθιέρωση ορθών διαγνώσεων, εν τη απουσία ευαίσθητων διαγνωστικών βιοδεικτών, ένα ποσοστό ~10% των ασθενών με NKN διαγιγνώσκεται λανθασμένα ακόμα και σήμερα (128). Ενώ πολυάριθμες παθήσεις θα μπορούσαν να μιμηθούν τη νόσο, παρακάτω αναφέρονται οι πιο συχνοί μιμητές που μπορεί λανθασμένα να διαγνωσθούν ως NKN και αριθμούνται επίσης ορισμένες σπανιότερες οντότητες (129).

Ασθενείς με σημεία προσβολής KKN

1. Σύνδρομο καλοηθών δεσμιδώσεων

Είναι συχνό στον γενικό πληθυσμό και αφορά σε ~70% των υγιών ατόμων (130). Δεν έχει συσχετιστεί με νευρομυϊκές παθήσεις και η διάγνωση του καθιερώνεται με τη βοήθεια του ηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου, όπου διαπιστώνεται η παρουσία δεσμιδικών δυναμικών, απουσία θετικών και ινιδικών δυναμικών. Έχει φανεί πως οι συναισθηματικές διαταραχές, η έλλειψη ύπνου και η κατανάλωση καφεΐνης επιβαρύνουν τη νόσο (131,132). Παρά τον καλοήθη χαρακτήρα, οι ασθενείς τείνουν να αιτιώνται υποκειμενική αδυναμία και αισθητικά συμπτώματα τα οποία συνήθως αποδράμουν μετά από καθησυχασμό των ασθενών (131,132). Η κύρια πηγή ανησυχίας των ασθενών είναι η σπάνια εξέλιξη περιστατικών με μεμονωμένες δεσμιδώσεις σε πλήρη NKN (133,134).

2. Πολυεστιακή κινητική νευροπάθεια (ΠΚΝ)

Η ΠΚΝ είναι μία σπάνια νοσολογική οντότητα, αρκετά σπανιότερη από τη ΝΚΝ (<1 άτομο ανά 100.000 πληθυσμού), η οποία τείνει να παρουσιάζεται σε νεότερα άτομα (με μέση ηλικία τα 40 έτη) ως αμιγώς κινητική διαταραχή, με αδυναμία και ατροφίες, ασύμμετρη πολυεστιακή προσβολή των άκρων πιο εκσεσημασμένη περιφερικά παρά κεντρικά – στα άνω παρά στα κάτω άκρα –, και προοδευτική επιδείνωση (135,136). Η ΠΚΝ θεωρείται πως είναι μία ανοσολογικά επαγόμενη κόμβο- ή παρακομβοπάθεια (135,137). Η έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει συσχετιστεί με επιδείνωση των συμπτωμάτων (138). Όμοια με τη ΝΚΝ, απουσιάζει η αισθητική συμπτωματολογία, ενώ τα κρανιακά νεύρα, οι προμηκικοί και αναπνευστικοί μύες δεν επηρεάζονται (135). Η διάγνωση του καθιερώνεται με τη βοήθεια του ηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου, όπου διαπιστώνεται το θεμελιώδες ηλεκτροφυσιολογικό χαρακτηριστικό της ΠΚΝ, η παρουσία μπλοκ αγωγιμότητας (139,140). Επικουρικά στη διάγνωση είναι τα αντι-γαγγλιοσιδικά αντισώματα έναντι GM1, τα οποία παρά τη χαμηλή τους ευαισθησία (~50%), προσφέρουν πολύτιμη βοήθεια σε διαγνωστικά ασαφείς περιπτώσεις με υψηλή κλινική υποψία για ΠΚΝ (141). Είναι πολύ σημαντικό η ΠΚΝ να διαφοροδιαγνωστεί από την ΝΚΝ λόγω του ιάσιμου δυναμικού της νόσου (142).

3. Νευραλγική αμυατροφία

Η νευραλγική αμυατροφία (σύνδρομο Parsonage-Turner ή ιδιοπαθής νευροπάθεια του βραχιονίου πλέγματος) τείνει να εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μέσης ηλικίας (20-70 ετών) (143). Ο μηχανισμός της νόσου δεν έχει διαλευκανθεί, αλλά η φυσική της πορεία είναι καλά καθορισμένη και επιτρέπει την ακριβή της διάγνωση. Συνήθως εισβάλλει με σοβαρό ασύμμετρο άλγος στην περιοχή του αυχένα, της ωμικής ζώνης ή του βραχίονα χωρίς να έχει προηγηθεί κάποιος τραυματισμός, και εν συνεχεία, με το πέρας ορισμένων ημερών ή εβδομάδων (συνήθως 1-2) εμφανίζεται μυϊκή αδυναμία και ατροφία στο σύστοιχο άνω άκρο

που ακολουθούν ριζιτική κατανομή αλλά δεν ακολουθούν την κατανομή των αισθητικών συμπτωμάτων (143). Σε ένα μικρό ποσοστό (~5%), οι κινητικές εκδηλώσεις μπορεί να εγκαθίστανται χωρίς να έχει προηγηθεί άλγος (143). Ιογενείς λοιμώξεις ή εμβολιασμοί συχνά προηγούνται της νόσου. Ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος είναι επικουρικός, με σημεία απονεύρωσης – επανανεύρωσης στους επηρεασμένους μύες και μειωμένα αισθητικά και κινητικά δυναμικά στις μελέτες αγωγιμότητας των νεύρων (144). Σημειώνεται πως η απουσία συμβατών ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων είναι συχνή και δεν αποκλείει τη διάγνωση της νόσου (144).

4. Κινητική ή κυρίως κινητική χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυριζονευροπάθεια (ΧΦΑΠ)

Η κινητική παραλλαγή της ΧΦΑΠ και η ΧΦΑΠ με κυρίως κινητική συμμετοχή πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από τη ΝΚΝ λόγω της ιάσιμης φύσης της νόσου (145). Είναι σχετικά σπάνιες παραλλαγές της ΧΦΑΠ (146,147). Η φυσική της πορεία (με υφέσεις και εξάρσεις), τα απεικονιστικά (με σημεία φλεγμονής πλεγμάτων – ριζών - νεύρων) και τα ηλεκτροφυσιολογικά της ευρήματα (υπέρ απομυελίνωσης) την ξεχωρίζουν με σχετική ευκολία από τη ΝΚΝ (146,147).

5. Σύνδρομο μετά από πολιομυελίτιδα

Παρά τον περιορισμό της νόσου και την επιτυχημένη εξάλειψη της σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές χάρη στην ενεργητική ανοσοποίηση του πληθυσμού, η πολιομυελίτιδα παραμένει ενδημική σε κάποιες χώρες ενώ καταγράφονται και περιπτώσεις που οφείλονται στην έμμεση προσβολή μη ανοσοποιημένων ατόμων από τη χρήση του ζώντος εξασθενημένου σκευάσματος που χορηγείται από το στόμα (κοπρανο-στοματική οδός) (148). Ενώ η οξεία χαλαρή παράλυση της νόσου διαχωρίζεται εύκολα από τη ΝΚΝ, το σύνδρομο μετά από

πολιομυελίτιδα συνήθως ακολουθεί μία παρατεταμένη περίοδο σταθερότητας, διαδράμει με προοδευτικά επιδεινούμενη αδυναμία, ατροφίες, δεσμιδώσεις και επώδυνες μυϊκές συσπάσεις, και πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από τη NKN (149). Συνήθως η κατανομή της αρχικής προσβολής συμπίπτει με την κατανομή της αδυναμίας στο σύνδρομο μετά από πολιομυελίτιδα (149).

6. Νωτιαία και προμηκική μυϊκή ατροφία (N-ΠΜΑ) – νόσος Kennedy

Η N-ΠΜΑ είναι ένα σπάνιο (1/300.000 άνδρες), εκφυλιστικό X-φυλοσύνδετο νόσημα του KKN, που προσβάλλει άνδρες με αυξημένες (>34) τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις CAG στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων (αυξημένες επαναλήψεις σχετίζονται με μεγαλύτερη διεισδυτικότητα, με πλήρη διεισδυτικότητα από 38 και περισσότερες επαναλήψεις) (150). Συνοδεύεται από πλειάδα εκδηλώσεων που οφείλονται σε μειωμένη ευαισθησία του υποδοχέα στα ανδρογόνα, πχ, γυναικομαστία, ατροφία όρχεων και υπογονιμότητα, και άλλες συστηματικές εκδηλώσεις όπως διαταραχή του μεταβολισμού με υπερλιπιδαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη και καρδιοπάθεια (151). Ηλεκτροφυσιολογικά διαπιστώνονται σημεία απώλειας KKN (νωτιαίοι και προμηκικοί πυρήνες) ενώ μπορεί να συνυπάρχουν ευρήματα αισθητικής νευροπάθειας (152).

7. Νωτιαία μυϊκή ατροφία (NMA)

Η NMA είναι μία γενετικά καθορισμένη διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από εκφύλιση των KKN των πρόσθιων κεράτων του ΝΜ και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου SMN-1, ενώ η σοβαρότητα της κλινικής συνδρομής σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου SMN-2 (153). Διαιρείται σε 5 υποτύπους, εκ των οποίων μόνο η NMA τύπου 4 (5% του συνόλου) ξεκινάει στην ενήλικη ζωή (154). Η NMA τύπου 4 χαρακτηρίζεται από ήπια κλινική εικόνα και φυσιολογική επιβίωση. Ο υπότυπος 0

χαρακτηρίζεται από ενδομήτρια έναρξη των συμπτωμάτων και βραχυπρόθεσμη επιβίωση (<6 μήνες), ο υπότυπος 1 χαρακτηρίζεται από νεογνική ή βρεφική εισβολή της νόσου (<6 μήνες) και επιβίωση <2 έτη, ο υπότυπος 2 παρουσιάζεται σε ηλικία <1.5 έτος και έχει μειωμένη επιβίωση (> από 2 έτη), και ο υπότυπος 3 εκδηλώνεται συνήθως μεταξύ 1.5 και 18 ετών (συχνότερα πριν τα 6 έτη) και παρουσιάζει φυσιολογική επιβίωση (με σημαντικότερες κινητικές διαταραχές να επιβαρύνουν τα άτομα με νεαρότερη ηλικία εισβολής) (153,154)

8. Προοδευτική μυϊκή ατροφία (ΠΜΑ)

Είναι μία εξαιρετικά σπάνια σποραδική κατά κύριο λόγο νόσος του ΚΚΝ με παρόμοια ηλικία έναρξης αλλά μεγαλύτερη επιβίωση από τη ΝΚΝ (155). Το ένα τέταρτο των ασθενών με ΠΜΑ θα αναπτύξουν σημεία πυραμιδικής προσβολής εντός 5 ετών από τη διάγνωση. Αμφισβητείται το κατά πόσο η εν λόγω οντότητα είναι ξεχωριστή ή ανήκει στο φάσμα της ΝΚΝ.

9. Νόσος Hirayama – μονομελική μυατροφία

Η νόσος Hirayama εκδηλώνεται ως καλοήθης μονομελική αμυατροφία συνήθως στα τέλη της εφηβείας – στην αρχή της ενήλικης ζωής. Εισβάλλει με αργή προοδευτική αδυναμία και ατροφία (σπάνια και με πυραμιδική σημειολογία) ενός εκ των άνω άκρων που εντός λίγων ετών καταλήγει σε μία σταθερή κλινική κατάσταση χωρίς περαιτέρω επιδείνωση.

Ασθενείς με σημεία προσβολής ΑΚΝ

1. Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ)

Η πρωτοπαθώς προϊούσα ΠΣ (ΠΠΠΣ) χαρακτηρίζεται από προοδευτική νευρολογική επιδείνωση και πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από τη ΝΚΝ λόγω των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών που καθυστερούν ή εμποδίζουν την εξέλιξη της νόσου (156). Πλειάδα νευρολογικών εκδηλώσεων συνήθως συνοδεύουν την πυραμιδική σημειολογία (διαταραχή όρασης, αισθητικά συμπτώματα, ορθοκυστικές διαταραχές, κα) και διαφοροποιούν την ΠΠΠΑ από τη ΝΚΝ, ενώ τα συνάδοντα εργαστηριακά (ενδοθηκική παραγωγή ανοσοσφαιρινών) και απεικονιστικά ευρήματα της νόσου θέτουν την τελική διάγνωση (157,158).

2. Οικογενής σπαστική παραπληγία (ΟΣΠ)

Η ΟΣΠ περιλαμβάνει μία ομάδα κληρονομικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από προοδευτικά επιδεινούμενη σπαστική παραπάρεση – παραπληγία (και άλλα σημεία πυραμιδικής προσβολής) και περιστασιακά από ορθοκυστικές διαταραχές, συμμετοχή των άνω άκρων ή και άλλα νευρολογικά σημεία (159). Πολλαπλές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα και έχουν συσχετιστεί με ετερογενείς φαινοτυπικές μορφές της νόσου (160).

3. Πρωτοπαθής πλαγία σκλήρυνση (ΠΠΣ)

Θεωρείται σπάνια, περιορισμένη φαινοτυπικά παραλλαγή της νόσου. Η διάγνωση της ΠΠΣ απαιτεί την πάροδο τουλάχιστον 4 ετών παρουσία συμπτωμάτων συμβατών με εκφύλιση του ΑΚΝ, χωρίς συμμετοχή του ΚΚΝ (161). Επομένως, οι ασθενείς με συμπτώματα συμβατά με ΠΠΣ είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται προοπτικά για ορισμένα έτη προτού καθιερωθεί η διάγνωση. Η ΠΠΣ είναι συχνότερη σε νεαρότερα άτομα (50-60 ετών) και έχει βραδύτερη εξέλιξη από την κλασική ΝΚΝ (90,162). Συχνότερα προοδεύει από τα κάτω, στα άνω άκρα και έπειτα προκαλεί ψευδοπρομηκική παράλυση (90,162).

Μυοπάθειες

1. Μυοσίτιδα εξ εγκλείστων σωματίων

Πρόκειται για μία σπάνια (2-5/100.000 άτομα), ιδιοπαθή φλεγμονώδη μυοπάθεια που προσβάλλει πρωτίστως άνδρες (3:1) >50 ετών και χαρακτηρίζεται από προοδευτική, ασύμμετρη αδυναμία των τετρακέφαλων, των αντιβραχίων και ραχιαίων καμπτήρων της ποδοκνημικής, σοβαρή διαταραχή της αυτόνομης ορθοστάτησης και συχνά δυσφαγία (163,164). Ο εργαστηριακός έλεγχος με αυξημένες τιμές κρεατινικής φωσφοκινάσης (cpk) και τα μυοπαθητικά ευρήματα του ηλεκτροφυσιολογικού ελέγχου συνηγορούν για τη διάγνωση που τίθεται με μεγαλύτερη βεβαιότητα με τη βοήθεια παρουσία χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών ευρημάτων (165).

2. Πολυμυοσίτιδα

Η πολυμυοσίτιδα, στα πλαίσια ή όχι δερματομυοσίτιδας, είναι μία φλεγμονώδης μυοπάθεια που προσβάλλει συνήθως 1-3 άτομα/ 10.000 πληθυσμού, με συμμετρική, προοδευτική αδυναμία των εγγύς μυών των άκρων (166). Οι περιπτώσεις με δυσφαγία επισύρουν μεγαλύτερη διαφοροδιαγνωστική δυσκολία ως προς τη ΝΚΝ. Τα χαρακτηριστικά δερματικά εξανθήματα (εφόσον υπάρχουν), οι συστηματικές εκδηλώσεις (πχ, μυοκαρδιοπάθεια), τα εργαστηριακά (αυξημένες τιμές cpk, αυτοαντισώματα) και ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα (μυοπαθητικά ευρήματα) κατευθύνουν προς τη συγκεκριμένη διάγνωση (166,167).

3. Μυϊκές δυστροφίες

Η οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία διαχωρίζεται από τον προμηκικό φαινότυπο της ΝΚΝ λόγω της συμμετοχής των οφθαλμικών μυών. Η μεμονωμένη μυοπάθεια των εκτεινόντων του αυχένα διαχωρίζεται από τον προμηκικό φαινότυπο της ΝΚΝ λόγω της περιορισμένης προσβολής των αυχενικών παρασπονδυλικών μυών.

Νοσήματα της νευρομυϊκής σύναψης - Μυασθένεια Gravis (MG)

Οι περιπτώσεις με δυσφαγία ή/και δυσαρθρία επισύρουν μεγαλύτερη διαφοροδιαγνωστική δυσκολία ως προς τη ΝΚΝ (168). Η παρουσία στοιχείου κόπωσης και διακύμανσης, η συμμετοχή των οφθαλμικών μυών, η ένρινη χροιά της φωνής, η απουσία ατροφίας και δεσμιδώσεων στον μυ της γλώσσας (ατροφίες και δεσμιδώσεις μπορεί να παρατηρούνται σε αντι-MuSK θετικές MG), η συμμετρική συμμετοχή των μυών των άκρων με προεξάρχουσα αδυναμία στους εγγύς μύες και τα χαρακτηριστικά εργαστηριακά (αυτοαντισώματα) και ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα (επαναλαμβανόμενος ερεθισμός – ΗΜΓ μονήρους δεσμίδας) επιβεβαιώνουν την παρουσία νοσήματος της νευρομυϊκής σύναψης (168,169).

Άλλες οντότητες με προεξάρχουσα προσβολή του ΑΚΝ ή/και ΚΚΝ (129,170–172)

Οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις (και άλλα πειστικά φαινόμενα) της ΣΣ μπορούν να εκδηλωθούν με προοδευτικά επιδεινούμενη αυχενική μυελοπάθεια και ριζοπάθεια και σημεία προσβολής ΑΚΝ και ΚΚΝ αντίστοιχα (συνήθως συνοδεύονται από αισθητικά συμπτώματα). Η συριγγομυελία δύναται να εκδηλωθεί με προοδευτική αδυναμία και ατροφία, κατηργημένα ή και ζωηρά τενόντια αντανακλαστικά, αισθητικά συμπτώματα και ορθοκυστικές διαταραχές. Προεξάρχουσα προσβολή του ΚΚΝ μπορεί να σε ριζοπάθεια επαγόμενη από ακτινοβολία (το ιστορικό ακτινοβολιών δύναται να προηγείται για ορισμένα έτη έως και δεκαετίες).

Ενδεικτικά, σημειώνονται οι παρακάτω σπάνιοι μιμητές της ΝΚΝ με προεξάρχουσα προσβολή του ΑΚΝ: επίκτητες μεταβολικές μυελοπάθειες: έλλειψη Β12 και έλλειψη χαλκού (συνήθως συνοδεύονται από αισθητικά συμπτώματα), κληρονομικά καθορισμένες μεταβολικές μυελοπάθειες: αδρενομυελονευροπάθεια (X-φυλοσύνδετη, οφειλόμενη σε μεταλλάξεις του ABCD1 γονιδίου) και άλλες λευκοδυστροφίες (μπορεί να συνοδεύονται από περιφερική νευροπάθεια).

Άλλες νόσοι που κατά περίπτωση μπορεί να επισύρουν διαφοροδιαγνωστικά διλλήματα είναι ορισμένες λοιμώξεις (πχ, W. Nile, HIV, νόσος Lyme, μυελίτιδα από ερπητοϊούς ή HTLV-1 & -2, τμηματική ζωστηροειδής πάρεση, κτλ.), άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα (πχ, η φλοιοβασική εκφύλιση, η μετωποκροταφική άνοια, οι νωτιαιοπαραεγκεφαλικές αταξίες, κτλ.), παρανεοπλασματικά σύνδρομα, διαιτητικές τοξικώσεις από φυτικής προέλευσης νευροτοξίνες (πχ, λαθουρισμός, νόσος Konzo, κτλ.), η ανεπάρκεια της εξωσαμινιδάσης A και άλλες GM2 γαγγλιοσιδώσεις, το σύνδρομο Morvan, η νόσος Niemann Pick, και άλλα.

Γενικά περί SNPs

Ο όρος “μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός” -ευρέως γνωστός με το ακρωνύμιο SNP, single nucleotide polymorphism- αντικατοπτρίζει τον πιο κοινό τύπο μεταξύ των γονιδιακών παραλλαγών, την παραλλαγή ενός μοναδικού νουκλεοτιδίου (μίας βάσης) σε μία έλικα DNA (173,174). Στη συντριπτική τους πλειοψηφία οι SNPs είναι διαλληλικοί (δύο αλλήλια) ή διαλληλομορφικοί (δύο αλληλόμορφα): επομένως όσον αφορά έναν συγκεκριμένο SNP είναι δυνατή η παρουσία τριών διαφορετικών γονοτύπων (πχ, A-A, A-B, B-B) (173,174). Σπανιότεροι είναι οι πολυαλληλομορφικοί ή πολυαλληλικοί πολυμορφισμοί (με περισσότερα των δύο αλληλόμορφα) (174,175).

Για να κατηγοριοποιηθεί ως SNP, η εκάστοτε παραλλαγή οφείλει να αφορά σε τουλάχιστον 1% του πληθυσμού (173,175). Η παρουσία SNPs είναι φυσιολογική και αναμενόμενη σε όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος (174). Κατά μέσο όρο ένας SNP εμφανίζεται ανά 300-2000 νουκλεοτίδια, δηλαδή υπάρχουν εκατομμύρια SNPs στο γονιδίωμα κάθε ανθρώπου (176). Συνολικά, στη βιβλιογραφία αναφέρονται περισσότεροι από μισό δισεκατομμύριο SNPs στον παγκόσμιο πληθυσμό.

Η παρουσία SNPs είναι συχνότερη στις μη κωδικοποιές περιοχές του γονιδιώματος και η χρησιμότητά τους είναι κυρίως στα πλαίσια των βιολογικών δεικτών μίας νόσου (173,174). Σπανιότερα, SNPs ανευρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές ή και σε κωδικοποιές περιοχές των γονιδίων. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι SNPs δύνανται να εμπλέκονται αμεσότερα στην παθογένεση της νόσου επηρεάζοντας τη λειτουργία του εκάστοτε γονιδίου (στην περίπτωση “μη συνώνυμων” παραλλαγών) (177). Σημειώνεται πως στην πλειοψηφία τους οι SNPs θεωρούνται φυσιολογικές παραλλαγές χωρίς αντίκτυπο σε παραμέτρους “υγείας” και ένα μικρότερο ποσοστό αυτών έχει συσχετιστεί με την παρουσία συγκεκριμένων νοσημάτων, απάντηση ή αντίδραση σε φαρμακευτικές ουσίες, ευαισθησία σε περιβαλλοντικές εκθέσεις ή τοξίνες, και άλλες παραμέτρους “υγείας”. Δεδομένων των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν (χαμηλό κόστος γονοτύπησης, εύκολη διαδικασία, κτλ), οι SNPs συγκεντρώνουν όλο και περισσότερο ενδιαφέρον και η χρήση τους εδραιώνεται στην ιατρική (μεταξύ άλλων επιστημονικών πεδίων).

Υπό μελέτη SNPs

Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη μελέτη τριών SNPs σε σχέση με τη NKN. Συγκεκριμένα, των 1) Myelin-associated Oligodendrocyte Basic Protein (MOBP) rs616147, 2) Sec1 Family Domain-containing Protein 1 (SCFD1) rs10139154 και 3) Cluster of Differentiation 33 (CD33) rs3865444.

MOBP rs616147

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MOBP βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 3, στη θέση 3p22.1 (178). Μεταξύ άλλων, η εν λόγω πρωτεΐνη θεωρείται πως είναι ένα δομικό συστατικό των ελύτρων μυελίνης και εμπλέκεται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (178). Έχει βρεθεί πως τα επίπεδα mRNA της MOBP είναι εξαιρετικά αυξημένα στα ολιγοδενδροκύτταρα, όπως επίσης και τα επίπεδα της Myelin Basic Protein

(MBP), με την οποία η MOBP μοιράζεται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά και αλληλοεπιδρά για τον σχηματισμό των ελύτρων μυελίνης (179,180).

Λαμβάνοντας υπόψη τον πιθανό βιολογικό ρόλο της MOBP, η εμπλοκή αυτής σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα και οντότητες που σχετίζονται με απομυελίνωση είναι δυνατή, πχ, Πολλαπλή Σκλήρυνση ή νόσος Alzheimer (181,182). Μέχρι σήμερα, η δημοσιευμένη βιβλιογραφία έχει συσχετίσει μεταλλάξεις στο γονίδιο της MOBP με νοσήματα όπως η Πολλαπλή Σκλήρυνση, η νόσος Alzheimer, η ΜΚΑ, Προοδευτική Υπερπυρηνική Παράλυση και Φλοιοβασική Εκφύλιση (που ανήκουν στο φάσμα της μετωποκροταφικής εκφύλισης), ενώ μελέτες ανοσοϊστοχημείας έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία MOBP στον πυρήνα των σωματίων Lewy σε άτομα με άνοια με σωματία Lewy ή άνοια της νόσου Parkinson (183–193). Βάσει της πιθανολογούμενης εμπλοκής των ολιγοδενδροκυττάρων στη NKN (η οποία υποστηρίζεται από παθολογοανατομικά ευρήματα), η MOBP θα μπορούσε να σχετίζεται και με τη NKN (194–197).

Όσον αφορά στον υπό μελέτη πολυμορφισμό, MOBP rs616147, εντοπίζεται σε μη κωδικοποιό περιοχή του γονιδίου (ιντρόνιο) και η κλινική του σημασία (εάν υφίσταται) παραμένει ασαφής (πριμοδοτείται το σενάριο του βιοδείκτη) (198). Βιβλιογραφικά, έχει μελετηθεί περισσότερο στη NKN σε σχέση με κάθε άλλη νόσο (υπάρχει μόνο μία μελέτη που έχει συσχετίσει τον πολυμορφισμό MOBP rs616147 με τη νόσο του Parkinson) (199). Αρχικά, το 2016, πρώτοι οι van Rheenen και συνεργάτες βασιζόμενοι στη γονοτύπηση ενός μεγάλου δείγματος (41 κοορτών από τη δυτική Ευρώπη και Αμερική – όχι από την Ελλάδα) αναγνώρισαν τον MOBP rs616147 σαν παράγοντα κινδύνου για NKN (60). Ακολούθως, οι Benyamin και συνεργάτες επιβεβαίωσαν την ανωτέρω συσχέτιση στον Ευρωπαϊκό αλλά όχι στον Κινέζικο πληθυσμό (200). Η συσχέτιση του MOBP rs616147 με τη NKN στον Ελληνικό πληθυσμό δεν είχε διερευνηθεί μέχρι τη διενέργεια της παρούσας μελέτης.

SCFD1 rs10139154

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SCFD1 βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 14, στη θέση 14q12 (201). Η εν λόγω πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των Senc1/Munk 18 (SM) πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική διακίνηση, τη μεμβανική συγχώνευση, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση, διεργασίες που εμπλέκονται και στην παθογένεση της NKN (202–204).

Ο πολυμορφισμός SCFD1 rs10139154 εντοπίζεται επίσης σε μη κωδικοποιό περιοχή του γονιδίου. Είχε αρχικά συσχετιστεί με NKN από τους van Rheenen και συνεργάτες στο μεγάλο Δυτικό-Ευρωπαϊκό και Αμερικάνικο δείγμα που ανέλυσαν (χωρίς άτομα ελληνικής καταγωγής) και στη συνέχεια από τους Chen και συνεργάτες με την ηλικία έναρξης της NKN σε μια Κινεζική κοορτή (60,205). Η συσχέτιση του SCFD1 rs10139154 με τη NKN στον Ελληνικό πληθυσμό δεν είχε διερευνηθεί μέχρι τη διενέργεια της παρούσας μελέτης. Πλην των ανωτέρω, υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία (μία μοναδική μελέτη) που να συσχετίζει τον εν λόγω πολυμορφισμό με τη νόσο Alzheimer (206).

CD33 rs3865444

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CD33 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19, στη θέση 19p13.33 (207). Η εν λόγω πρωτεΐνη είναι μία διαμεμβρανική sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin (siglec) που βρίσκεται πρωτίστως σε υπότυπους λευκοκυττάρων και θεωρείται πως υπεισέρχεται στις ρυθμιστικές διαδικασίες ανοσολογικών και φλεγμονωδών απαντήσεων (207, 208).

Παραλλαγές του γονιδίου CD33 έχουν συσχετιστεί με διάφορα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Ο πολυμορφισμός CD33 rs3865444 συγκεκριμένα βρίσκεται σε μία ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου CD33 και φαίνεται πως σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης CD33 και κατ' επέκταση με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως ο

CD33 rs3865444 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της CD33 στην επιφάνεια της μικρογλοίας (210). Η μικρογλοία στη συνέχεια εμφανίζει αυξημένες δυνατότητες φαγοκυττάρωσης του β-αμυλοειδούς (οι δημοσιευμένες μελέτες αφορούν στη συντριπτική τους πλειοψηφία ασθενείς με ν. Alzheimer) (211). Εικάζεται, λοιπόν, πως ο CD33 rs3865444 διαφοροποιεί την ισορροπία ανάμεσα στις ομοιοστατικές και επιβλαβείς φλεγμονώδεις διεργασίες υπέρ των πρώτων, και κατά αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να σχετίζεται αρνητικά (προστατευτικός παράγοντας) με τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

Ο εν λόγω πολυμορφισμός έχει ήδη συσχετιστεί αρνητικά με τις νόσους Alzheimer και Parkinson, ενώ πιθανώς υπεισέρχεται και στην παθογένεση της Πολλαπλής Σκλήρυνσης (212–215). Η συσχέτιση του CD33 rs386544 με τη NKN δεν είχε διερευνηθεί μέχρι τη διενέργεια της παρούσας μελέτης. Λαμβάνοντας υπόψη την εκτενή αλληλοεπικάλυψη στο φάσμα της νευροεκφύλισης, είναι δυνατό ο εν λόγω πολυμορφισμός να υπεισέρχεται και στην παθογένεση της NKN (216).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία οι SNPs MOBP rs616147 και SCFD1 rs10139154 έχουν συσχετιστεί με NKN στον δυτικό-ευρωπαϊκό και αμερικάνικο πληθυσμό αλλά όχι στον ασιατικό (μη σημαντικά αποτελέσματα), ενώ απουσιάζει πλήρως η διερεύνηση αυτών των πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Από την άλλη, ο ρόλος του CD33 rs3865444 δεν έχει μελετηθεί καθόλου στη NKN – σε κανέναν πληθυσμό. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των εν λόγω SNPs και της NKN.

Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία της παρούσας μελέτης ακολουθεί της αρχές των candidate gene analyses (μελέτες υποψήφιων γονιδίων). Για τους προαναφερθέντες λόγους, διερευνήθηκαν επιλεκτικά οι συγκεκριμένοι υποψήφιοι SNPs με βάση τη συσχέτιση τους σε άλλους πληθυσμούς και την πιθανή συμμετοχή τους στον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου. Η χρήση της εν λόγω μεθόδου ενδείκνυται για την διερεύνηση συγκεκριμένων παθογενετικών υποθέσεων και την επιβεβαίωση ευρημάτων άλλου τύπου μελετών, καθώς η στοχευμένη γονιδιακή ανάλυση μειώνει εξαιρετικά το κόστος γονοτύπησης και τις απαιτήσεις ως προς το μέγεθος του δείγματος. Για τον σκοπό της παρούσας ανάλυσης, επομένως, διενεργήθηκε μία μελέτη πασχόντων (ασθενών με διάγνωση NKN) – μαρτύρων. Η συσχέτιση της πιθανότητας και της ηλικίας νόσησης μελετήθηκε ξεχωριστά για κάθε SNP.

Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Οι συμμετέχοντες εντοπίστηκαν προοπτικά στη Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού

Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Πρόταση συμμετοχής απευθύνθηκε διαδοχικά σε κάθε ασθενή με ALS που παρουσιάστηκε στη Νευρολογική κλινική μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού μεγέθους δείγματος. Κατά αυτό τον τρόπο επιχειρήσαμε να μην επηρεάσουμε επιλεκτικά την αντιπροσωπευτικότητα των συμμετεχόντων. Η διάγνωση της νόσου βασίστηκε στα αναθεωρημένα κριτήρια El-Escorial και καθιερώθηκε από έναν ειδικό νευρολόγο με εμπειρία στις νευρομυικές διαταραχές.

Παράλληλα, υγιείς μάρτυρες από την κοινότητα επιλέχθηκαν τυχαία, με τη διαδικασία της εξατομικευμένης αντιστοίχισης βάσει φύλου-ηλικίας με του πάσχοντες. Συγκεκριμένα για κάθε νοσούντα από NKN, επιλέχθηκε ένας υγιής μάρτυρας του ίδιου φύλου και παρόμοιας ηλικίας, ± 2 έτη. Αναλυτικά οι προϋποθέσεις συμμετοχής και για τις δύο ομάδες ήταν οι παρακάτω:

Κριτήρια εισαγωγής πασχόντων:

- Ηλικία > 18 έτη, ανεξαρτήτως φύλου
- Ελληνική εθνικότητα
- Διάγνωση NKN σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια El Escorial.
- Ικανότητα του υποψηφίου να συμμορφωθεί στις διαδικασίες της μελέτης
- Ικανότητα του υποψηφίου να παρέχει συγκατάθεση μετά από ενημέρωση

Κριτήρια αποκλεισμού πασχόντων:

- Ατομικό αναμνηστικό άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών
- Οικογενειακό ιστορικό NKN (ή παραλλαγών) ή MKA

Κριτήρια εισαγωγής υγιών μαρτύρων:

- Ηλικία > 18 έτη, ανεξαρτήτως φύλου
- Ελληνική εθνικότητα
- Απουσία άλλης νευρολογικής νόσου
- Ικανότητα του υποψηφίου να συμμορφωθεί στις διαδικασίες της μελέτης
- Ικανότητα του υποψηφίου να παρέχει συγκατάθεση μετά από ενημέρωση

Κριτήρια αποκλεισμού υγιών μαρτύρων:

- Οικογενειακό ιστορικό NKN (ή παραλλαγών) ή MKA

Εργαστηριακές τεχνικές

Απομόνωση DNA

Βασική προϋπόθεση για την ανάλυση του DNA είναι η σωστή και αποδοτική απομόνωση αυτού από τα κύτταρα. Για να συμβεί αυτό το DNA θα πρέπει να μην περιέχει προσμίξεις και να μην έχει καταταμηθεί σε πολύ μικρού μεγέθους τεμάχια που δεν είναι εφικτό να ενισχυθούν και να αναλυθούν.

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε στις παρούσες αναλύσεις προερχόταν από δείγματα περιφερικού αίματος που λήφθηκαν από τους συμμετέχοντες. Συγκεκριμένα η απομόνωση του DNA έγινε από εμπύρνηνα λευκοκύτταρα με βάση τη μέθοδο της εξαλάτωσης (57). Λήφθηκαν περίπου 10ml περιφερικού αίματος από κάθε συμμετέχοντα, τα οποία εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό Na₂EDTA. Παρακάτω απαριθμούνται τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για να πραγματοποιηθούν οι διαδικασίες απομόνωσης γενετικού υλικού:

1. Διαλύματα διάσπασης πυρήνων
Lysis 1: NH₄Cl (155mM), KHCO₃ (10mM), EDTA (1mM), Ph=7.4
Lysis 2: Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na ESTA (2mM), Ph=8.2
2. Διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml)
3. Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfates)
4. Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M)
5. Απόλυτη αιθανόλη
6. CH₃COONa (3M)
7. Πηκτή αγαρόζης 1%

Παρακάτω ακολουθεί η περιγραφή της διαδικασίας εξαλάτωσης:

Ημέρα 1

1. Τοποθέτηση του αίματος σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώση στα 12ml με ddH₂O (δύο αποσταγμένο νερό). Καλή ανάδευση ώστε να επιτευχθεί λύση των ερυθρών κυττάρων.
2. Φυγοκέντρηση με συχνότητα 3500rpm για συνολική διάρκεια 15 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C.
3. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης απορρίπτεται. Το ίζημα χρησιμοποιείται στα επόμενα στάδια. Τα κύτταρα ανανεώνονται εκ νέου με χρήση ddH₂O στα 12ml και ακολουθεί ανακίνηση σε vortex.
4. Εκ νέου φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν νωρίτερα: 3500rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης απορρίπτεται. Στο ίζημα προστίθεται διάλυμα Lysis 1 μέχρι τη δημιουργία συνολικού διαλύματος 12ml.
6. Εκ νέου φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν νωρίτερα: 3500rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
7. Επανάληψη των βημάτων 5 & 6 με χρήση διαλύματος Lysis 1.
8. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη διαδικασία της φυγοκέντρησης απορρίπτεται. Προτίθεται διάλυμα Lysis 2 μέχρι τη δημιουργία συνολικού διαλύματος 6ml. Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση για συνολικό διάστημα 15-30 λεπτά, σε συνθήκες δωματίου.
9. Έπειτα, προστίθενται 750μl διαλύματος SDS 10% w/v και 100μl πρωτεΐνης K 10mg/ml.
10. Το διάλυμα επωάζεται για συνολικό διάστημα 16-18 ωρών (overnight – ON) σε θερμοκρασία 37°C.

Για την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας σημειώνονται τα παρακάτω:

- τα διαλύματα Lysis 1 & 2 ευοδώνουν τη λύση των πυρηνικών μεμβανών παρέχοντας πρόσβαση στο πυρηνικό DNA. Τα εν λόγω διαλύματα παράλληλα συνεισφέρουν στη διαδικασία μέσω της δέσμευσης δισθενών κατιόντων, δηλαδή Ca^{2+} και Mg^{2+} , χάρη στο EDTA που περιέχουν. Τα δισθενή κατιόντα παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διάσπαση του DNA από τις νουκλεάσες, επομένως, η δέσμευση τους αποτρέπει την κατάτμηση του DNA σε πολύ μικρά τεμάχια.
- το SDS σε συνδυασμό με την πρωτεΐνάσης K ευοδώνουν την αποδόμηση των πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA. Επιπλέον, το SDS συνεισφέρει στην καταστροφή της πυρηνικής μεμβράνης και στην αποδιάταξη των συσπειρωμένων ινιδίων χρωματίνης.

Ημέρα 2

Αρχικά, προστίθενται 2ml κορεσμένου διαλύματος NaCl (6M) και το μείγμα αναδεύεται για συνολικά 15 δευτερόλεπτα ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί αποδιάταξη.

1. Φυγοκέντρωση με συχνότητα 3500rpm για συνολική διάρκεια 15 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C.
2. Απόρριψη του ιζήματος και μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το DNA σε νέο, καθαρό σωληνάριο. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
3. Εκ νέου φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες που περιεγράφηκαν νωρίτερα: 3500rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
4. Απόρριψη του ιζήματος και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο, καθαρό σωληνάριο χωρητικότητας 50ml.
5. Το νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο υπερκείμενο καταβυθίζεται με διπλάσιο όγκο απόλυτης αιθανόλης και υποδεκαπλάσιο όγκο CH₃COONa (3M). Δε χρειάζεται η προσθήκη CH₃COONa (3M) εφόσον κριθεί πως η αρχική ποσότητα του αίματος είναι αρκετή.
6. Το διάλυμα επωάζεται στους -20 °C ON.

Ημέρα 3

1. Φυγοκέντρωση με συχνότητα 3500rpm για συνολική διάρκεια 50 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C.
2. Απόρριψη του υπερκείμενου. Συλλογή του DNA, το οποίο έπειτα “ξεπλένεται” με διάλυμα αιθανόλης 70% και μεταγγίζεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα.
3. Φυγοκέντρωση με συχνότητα 12000rpm για συνολική διάρκεια 30 λεπτών σε θερμοκρασία 4°C.
4. Επανάληψη των σταδίων 2 & 3 άλλες δύο φορές με τροποποίηση της συνολικής διάρκειας φυγοκέντρωσης στα 20 λεπτά.
5. Απόρριψη του υπερκείμενου. Το ίζημα (DNA) παραμένει στο σωληνάριο το οποίο εν συνεχεία καλύπτεται με παραφίλμ. Στο παραφίλμ δημιουργείται μία μικρή τρύπα με χρήση μικροσκοπικής καρφίτσας, μέσω της οποίας απομακρύνεται εξατμιζόμενη η αιθανόλη που παρέμεινε στο σωληνάριο.
6. Το σωληνάριο επωάζεται σε συνθήκες ψυγείου.
7. Φυλάσσεται στους 4°C (όταν αναμένεται η άμεση και συχνή χρήση αυτού) ή στους -20°C (όπου μπορεί να συντηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα).

Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης DNA

Μικρή ποσότητα DNA χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το DNA γίνεται ορατό και ελέγχεται η ποιότητα του με τη χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται με φωτομέτρηση με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η εν λόγω διαδικασία βασίζεται στην εκλεκτική απορρόφηση ακτινοβολίας με μήκος κύματος 260nm από το DNA, που επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα (OD) του αραιωμένου υδατικού διαλύματος DNA (1:100) σε δύο μήκη κύματος, 260nm και 280nm. Η απορρόφηση από το DNA αντιστοιχεί -όπως ειπώθηκε- στο πρώτο μήκος κύματος, ενώ η απορρόφηση στο δεύτερο μήκος κύματος αντιπροσωπεύει τις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που δεν απομακρύνθηκαν επιτυχώς από το δείγμα. Έπειτα αξιολογείται ο λόγος OD_{260}/OD_{280} και τιμές μεταξύ 1.7 και 1.9 μεταφράζονται ως ενδεικτικές επαρκώς “καθαρού” DNA. Αντίθετα, τιμές χαμηλότερες του 1.7 υποδηλώνουν πρόσμιξη με πρωτεΐνες, ενώ τιμές υψηλότερες του 1.9 συνάδουν με πρόσμιξη με RNA.

Εν συνεχεία, βάσει του παρακάτω τύπου μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA: Συγκέντρωση σε $\mu\text{g/ml}$ = αραιώση * 50 * τιμή OD_{260} . Ο παραπάνω τύπος στηρίζεται στην απόδειξη πως σε μήκος κύματος 260nm συγκέντρωση δίκλωνου DNA ίση με 50 $\mu\text{g/ml}$ παρουσιάζει OD ίση με 1. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι εξαιρετική και επιτρέπει ανίχνευση ποσοτήτων DNA μεγαλύτερες των 0.2 $\mu\text{g DNA/ml}$ διαλύματος.

Polymerase chain reaction - PCR

Απαραίτητα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι τα ακόλουθα:

1. Taq DNA πολυμεράση
2. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την Taq DNA πολυμεράση
3. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών
4. Διάλυμα ελεύθερων 5-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)
5. Κατάλληλης συγκέντρωσης διάλυμα $MgCl_2$ (μεταξύ 1.5 και 2.0 mM)
6. Μικρή ποσότητα DNA εκμαγείου - μήτρας

Η PCR χρησιμοποιείται για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω ενζυμικής αναπαραγωγής. Η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA είναι απαραίτητη, γιατί η πολυμεράση του DNA χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Για την έναρξη της σύνθεσης, απαιτείται ένα μικρό αρχικό τμήμα δίκλωνου DNA. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που προσαρμόζεται σε ένα συγκεκριμένο σημείο του μονόκλωνου DNA, από όπου ξεκινάει η ενζυμική επιμήκυνση – η σύνθεση της συμπληρωματική αλυσίδα. Χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές που προσαρμόζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου, μπορούν να καθοριστούν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ενώ οι παραχθέντες κλώνοι χρησιμοποιούνται επίσης ως εκμαγεία στους επόμενους κύκλους (διπλασιάζοντας τα θραύσματα DNA σε κάθε κύκλο αναπαραγωγής) μέχρι την επιθυμητή ενίσχυση του αρχικού γενετικού υλικού. Μετά από ορισμένους κύκλους, το προϊόν DNA που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία είναι η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο τμήμα μεταξύ των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Κάθε κύκλος διπλασιασμού της PCR πραγματοποιείται με τη βοήθεια θερμικού κυκλοποιητή και λαμβάνει χώρα σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf. Παρακάτω απαριθμούνται τα τρία στάδια που λαμβάνουν χώρα σε κάθε κύκλο αναπαραγωγής:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Υβριδισμός εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του μονόκλωνου DNA στόχου (primer annealing)
3. Επιμήκυνση των εκκινητών – σύνθεση του DNA (extension).

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει μία διαδοχική εναλλαγή μεταξύ υψηλών, σχετικά χαμηλών και ενδιάμεσων θερμοκρασιών που εξυπηρετούν τα παρακάτω:

1. Υψηλή θερμοκρασία – διαχωρισμός αλυσίδων DNA
2. Σχετικά χαμηλή θερμοκρασία – προσαρμογή των εκκινητών
3. Ενδιάμεση θερμοκρασία – επιμήκυνση των εκκινητών

Γονοτύπηση κατά Taqman

Η μέθοδος κατά Taqman χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό SNPs σε ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA (217). Ουσιαστικά αποτελεί PCR σε πραγματικό χρόνο (real time PCR). Η real time PCR συνιστά παραλλαγή της κλασικής PCR και επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιας αλληλουχίας ταχύτερα και αποδοτικότερα, σε πραγματικό χρόνο. Η αντίδραση παρακολουθείται ενόσω εξελίσσεται μέσω μιας φθορίζουσας ουσίας η οποία σε κάθε κύκλο αυξάνεται.

Συγκεκριμένα, στη μέθοδο κατά Taqman χρησιμοποιείται ένας Taqman ιχνηθέτης που είναι συμπληρωματικός του υπό μελέτη πολυμορφισμού. Ο ιχνηθέτης περιέχει μία φθορίζουσα χρωστική και μία μη-φθορίζουσα χρωστική που απορροφά το σήμα της πρώτης εφόσον βρίσκονται σε εγγύτητα. Στην περίπτωση που ο υπό μελέτη πολυμορφισμός υπάρχει, ο ιχνηθέτης προσαρμόζεται στο αντίστοιχο τμήμα και κατά την επιμήκυνση η πολυμεράση υδρολύει τον Taqman ιχνηθέτη και διακόπτει την απορρόφηση του σήματος της φθορίζουσας χρωστικής οδηγώντας στην παραγωγή φθορισμού. Απουσία του υπό μελέτη πολυμορφισμού δεν παρατηρείται φθορισμός.

Η γονοτύπηση κατά Taqman διενεργήθηκε σε ABI PRISM 7900 Sequence Detection System και αναλύθηκε με SDS software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (218). Για να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, 10% του συνόλου των δειγμάτων επιλέχθηκαν τυχαία για επαναληπτική γονοτύπηση.

Στατιστική ανάλυση

Ως πρωταρχικές εκβάσεις (primary outcomes) ορίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των MOBP rs616147, CD33 rs3865444, και SCFD1 rs10139154 και της NKN. Ως δευτερεύουσες εκβάσεις ορίστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των MOBP rs616147, CD33 rs3865444, και SCFD1 rs10139154 και της ηλικίας έναρξης της NKN.

Το μέγεθος του δείγματος που απαιτούνταν για την επίτευξη στατιστικής ισχύος της τάξης άνω του 80% υπολογίστηκε ξεχωριστά για τους τρεις SNPs με CaTS Power Calculator (http://csg.sph.umich.edu//abecasis/cats/gas_power_calculator/index.html) . Το μεγαλύτερο απαιτούμενο μέγεθος λήφθηκε υπόψη (ώστε να επαρκεί για όλους τους SNPs). Για τον υπολογισμό της στατιστικής ισχύος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δεδομένα: επιπολασμός νόσου 5/100.000 πληθυσμού, συχνότητα ελάσσονος αλληλίου (minor allele frequency) στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς 31% για τον MOBP rs616147, 32% για τον CD33 rs3865444, και 37% για τον SCFD1 rs10139154, και ένας μέτρια αυξημένος σχετικός κίνδυνος της τάξης του 1.60 σε σχέση με το κύριο αλληλίο (major allele) σε multiplicative μοντέλα (219). Με τα ανωτέρω δεδομένα ένα δείγμα 300 ατόμων (150 πάσχοντες και 150 υγιείς μάρτυρες) υπολογίστηκε επαρκές να αναδείξει με >80% πιθανότητα την παρουσία ενδεχόμενων συσχετίσεων μεταξύ όλων των SNPs και της NKN, εφόσον υπάρχουν.

Ως υποκατάστατο δείκτη ποιότητας, υπολογίστηκε ο δείκτης Hardy-Weinberg (HW) στους υγιείς μάρτυρες. Σύμφωνα με τον δείκτη HW, οι συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων αναμένεται να είναι σταθερές από γενιά σε γενιά εκτός κι αν υφίσταται κάποιο

εξελικτικό ερέθισμα που μπορεί να προκαλέσει εκτροπή αυτών. Απουσία ισορροπίας κατά HW συνηγορεί προς λάθη γονοτύπησης ή δειγματοληψίας. Ο υπολογισμός του δείκτη HW βασίζεται στη στατιστική δοκιμασία χ^2 .

Το λογισμικό SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του μεγέθους της εκάστοτε συσχέτισης [Odds Ratio (OR)] και της ακρίβειας των εν λόγω υπολογισμών με τη μορφή 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης [95% confidence intervals (CIs)] (220). Κάθε πολυμορφισμός αναλύθηκε με βάση τα 5 βασικά μοντέλα διαλληλικής κληρονομικότητας (mt:mutant type = έλασσον αλλήλιο και wt:wild type = μείζον αλλήλιο) (221):

4. Επικρατής τύπος – Dominant
mt/mt + mt/wt vs. wt/wt
5. Υπολειπόμενος τύπος – Recessive
mt/mt vs. wt/wt + mt/wt
6. Υπερκυρίαρχος τύπος Over-dominant
mt/wt vs. mt/mt + wt/wt
7. Συν-επικρατής τύπος - Co-dominant
(υπολογίζεται ένα omnibus p-value με 2 degrees of freedom και 2 ORs)
mt/wt vs. wt/wt, mt/mt vs. wt/wt
8. Συσσωρευτικός τύπος – Additive
mt/mt vs. mt/wt vs. wt/wt (προϋποθέτει διπλασιασμό του σχετικού κινδύνου ανά επιπλέον mt)

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συσχέτιση των υπό μελέτη πολυμορφισμών με την ηλικία έναρξης της NKN με τη χρήση Cox proportional hazards μοντέλων. Κάθε SNP αναλύθηκε σε ξεχωριστό μοντέλο ως τριμεταβλητή (0 – 1 – 2 mt). Παρέχονται οι σχετικές αναλογίες

κινδύνου [Hazard Ratio (HR)] και η ακρίβεια των εν λόγω υπολογισμών με τη μορφή 95% CIs. Διενεργήθηκαν τόσο μη- όσο και σταθμισμένες ως προς το φύλο αναλύσεις.

Ως κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε συμβατικά το 5% ($\alpha = 0.05$).

Αποτελέσματα

Συνολικά, 155 ασθενείς με NKN και 155 υγιείς μάρτυρες εξατομικευμένα αντιστοιχισμένοι βάσει ηλικίας και φύλου συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη. Τα χαρακτηριστικά της πάσχουσας κοορτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Ο αριθμός των συμμετεχόντων ήταν εκουσίως >150 ανά ομάδα λόγω της αναμενόμενης αποτυχημένης γονοτύπησης σε ένα μικρό ποσοστό. Όσον αφορά στον MOBP rs616147, η γονοτύπηση ήταν επιτυχημένη στο 99.03% των συμμετεχόντων (152 ασθενών με NKN και 155 υγιών μαρτύρων). Ως προς τον SCFD1 rs10139154, η γονοτύπηση ήταν επιτυχημένη στο 98.06% των συμμετεχόντων (152 ασθενών με NKN και 152 υγιών μαρτύρων). Τέλος, σχετικά με τον CD33 rs3865444, η γονοτύπηση ήταν επιτυχημένη στο 99.68% των περιπτώσεων (155 ασθενών με NKN και 154 υγιών μαρτύρων). Όλοι οι SNPs βρισκόταν σε ισορροπία κατά HW στους υγιείς μάρτυρες.

Πίνακας 4 Χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων με νόσο του κινητικού νευρώνα

Ηλικία (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση)	63.74 \pm 11.30
Φύλο (γυναίκες/άνδρες)	77/78
Δεξιότητα με τα χέρια (δεξιόχειρας/αριστερόχειρας)	136/19
Χρόνια φοίτησης σε σχολείο και πανεπιστήμιο (≤ 6 , >6)	114/41
Κατανάλωση αλκοόλ (ναι/όχι)	104/51
Κάπνισμα (ναι/όχι)	106/49
Περιοχή πρώτης εμφάνισης των συμπτωμάτων (προμηκικά/ νωτιαία/ ταυτόχρονη εμφάνιση)	50/97/8

MOBP rs616147 (222)

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι συχνότητες όλων των αλληλίων και των γονοτύπων. Το έλασσον αλληλίο ανευρέθηκε σε 29% των πασχόντων και σε 33% των μαρτύρων, αμφότερες συχνότητες συγκρίσιμες με τη μέση συχνότητα του συνολικού ευρωπαϊκού πληθυσμού, δηλαδή 31%.

Πίνακας 5 Συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων για τον MOBP rs616147 σε πάσχοντες από NKN (νόσο του κινητικού νευρώνα) και υγιείς μάρτυρες. Όπου A: mutant allele και όπου G: wild type allele.

	Πάσχοντες από NKN	Υγιείς μάρτυρες	Συνολικό δείγμα
Γονότυποι	152 (%)	155 (%)	307 (%)
A/A	17 (11%)	17 (11%)	34 (11%)
G/A	55 (36%)	68 (44%)	123 (40%)
G/G	80 (53%)	70 (45%)	150 (49%)
Αλληλία	304	310	614
A	89 (29%)	102 (33%)	191 (31%)
G	215 (71%)	208 (67%)	423 (69%)

Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του MOBP rs616147 και της παρουσίας NKN, σύμφωνα με όλα τα μοντέλα κληρονομικότητας (Πίνακας 6). Επίσης, τα Cox μοντέλα (σταθμισμένα και μη) ανέδειξαν πως ο MOBP rs616147 δεν επιδρά στην ηλικία έναρξης της NKN (Πίνακας 7).

Πίνακας 6 Συσχέτιση μεταξύ MOBPs rs616147 και νόσου του κινητικού νευρώνα. Όπου A: mutant allele και όπου G: wild type allele.

Πρότυπο Κληρονομικότητας	Γονότυπος	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P value
Co-dominant	G/G	1.00	.37
	G/A	0.71 (0.44, 1.14)	
	A/A	0.88 (0.42, 1.84)	
Dominant	G/G	1.00	.19
	G/A-AA	0.74 (0.47, 1.16)	
Recessive	G/A-G/G	1.00	.95
	A/A	1.02 (0.50, 2.09)	
Over-dominant	G/G-A/A	1.00	.17
	G/A	0.73 (0.46, 1.15)	
Log-additive	-	0.85 (0.61, 1.19)	.35

Πίνακας 7 Συσχέτιση μεταξύ MOBPs rs616147 και ηλικίας έναρξης της νόσου του κινητικού νευρώνα). Όπου A: mutant allele και όπου G: wild type allele.

Γονότυπος	Μη σταθμισμένο μοντέλο		Σταθμισμένο για το φύλο	
	Hazard Ratio (95%CI)	p-value	Hazard Ratio (95%CI)	p-value
G/G	1.00		1.00	
G/A	1.12 (0.80, 1.59)	.51	1.11 (0.79, 1.56)	.56
A/A	0.91 (0.54, 1.54)	.71	0.94 (0.55, 1.60)	.82

SCFD1 rs10139154 (223)

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι συχνότητες όλων των αλληλίων και των γονοτύπων. Το έλασσον αλληλίο ανευρέθηκε σε 35% των πασχόντων και σε 38% των μαρτύρων, αμφότερες συχνότητες συγκρίσιμες με τη μέση συχνότητα του συνολικού ευρωπαϊκού πληθυσμού, δηλαδή 37%.

Πίνακας 8 Συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων για τον SCFD1 rs10139154 σε πάσχοντες από NKN (νόσο του κινητικού νευρώνα) και υγιείς μάρτυρες. Όπου T: mutant allele και όπου C: wild type allele.

	Υγιείς μάρτυρες	Πάσχοντες από NKN	Συνολικό δείγμα
Γονότυποι	152 (%)	152 (%)	307 (%)
C/C	62 (41%)	67 (44%)	129 (43%)
C/T	64 (42%)	64 (42%)	128 (42%)
T/T	26 (17%)	21 (14%)	47 (15%)
Αλληλία	304	304	608
C	188 (62%)	198 (65%)	368 (63%)
T	116 (38%)	106 (35%)	222 (37%)

Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του SCFD1 rs10139154 και της παρουσίας NKN, σύμφωνα με όλα τα μοντέλα κληρονομικότητας (Πίνακας 9). Επίσης, τα Cox μοντέλα (σταθμισμένα και μη) ανέδειξαν πως ο SCFD1 rs10139154 δεν επιδρά στην ηλικία έναρξης της NKN (Πίνακας 10).

Πίνακας 9 Συσχέτιση μεταξύ SCFD1 rs10139154 και νόσου του κινητικού νευρώνα. Όπου T: mutant allele και όπου C: wild type allele.

Πρότυπο Κληρονομικότητας	Γονότυπος	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P value
Co-dominant	C/C	1.00	.70
	C/T	0.93 (0.57, 1.51)	
	T/T	0.75 (0.38, 1.46)	
Dominant	C/C	1.00	.56
	C/T-T/T	0.87 (0.55, 1.38)	
Recessive	C/T-C/C	1.00	.43
	T/T	0.78 (0.42, 1.45)	
Over-dominant	C/C-T/T	1.00	.99
	C/T	1.00 (0.63, 1.58)	
Log-additive	-	0.88 (0.64, 1.21)	.42

Πίνακας 10 Συσχέτιση μεταξύ SCFD1 rs10139154 και ηλικίας έναρξης της νόσου του κινητικού νευρώνα). Όπου T: mutant allele και όπου C: wild type allele.

Γονότυπος	Μη σταθμισμένο μοντέλο		Σταθμισμένο για το φύλο	
	Hazard Ratio (95%CI)	p-value	Hazard Ratio (95%CI)	p-value
C/C	1.00		1.00	
C/T	0.91 (0.64, 1.28)	.58	0.88 (0.62, 1.24)	.47
T/T	1.03 (0.63, 1.68)	.91	1.04 (0.63, 1.70)	.89

CD33 rs3865444

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται οι συχνότητες όλων των αλληλίων και των γονοτύπων. Το έλασσον αλληλίο ανευρέθηκε σε 23% των πασχόντων και σε 26% των μαρτύρων, αμφότερες συχνότητες σχετικά μικρότερες από τη μέση συχνότητα του συνολικού ευρωπαϊκού πληθυσμού, δηλαδή 32%.

Πίνακας 11 Συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων για τον CD33 rs3865444 σε πάσχοντες από NKN (νόσο του κινητικού νευρώνα) και υγιείς μάρτυρες. Όπου A: mutant allele και όπου C: wild type allele.

	Πάσχοντες από NKN	Υγιείς μάρτυρες	Συνολικό δείγμα
Γονότυποι	155 (%)	154 (%)	307 (%)
C/C	90 (58)	82 (53)	172 (56)
C/A	59 (38)	64 (42)	123 (40)
A/A	6 (4)	8 (5)	14 (5)
Αλληλία	310	308	618
C	239 (0.77)	228 (74)	467 (76)
A	71 (0.23)	80 (26)	151 (24)

Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του CD33 rs3865444 και της παρουσίας NKN, σύμφωνα με όλα τα μοντέλα κληρονομικότητας (Πίνακας 12). Επίσης, τα Cox μοντέλα (σταθμισμένα και μη) ανέδειξαν πως ο CD33 rs3865444 δεν επιδρά στην ηλικία έναρξης της NKN (Πίνακας 13).

Πίνακας 12 Συσχέτιση μεταξύ CD33 rs3865444 και νόσου του κινητικού νευρώνα. Όπου A: mutant allele και όπου C: wild type allele.

Πρότυπο Κληρονομικότητας	Γονότυπος	Odds Ratio (95% Confidence Interval)	P value
Co-dominant	C/C	1.00	0.65
	C/A	0.84 (0.53-1.33)	
	A/A	0.68 (0.23-2.05)	
Dominant	C/C	1.00	0.39
	C/A-A/A	0.82 (0.52-1.29)	
Recessive	C/C-C/A	1.00	0.58
	A/A	0.73 (0.25-2.17)	
Over-dominant	C/C-A/A	1.00	0.53
	A/C	0.86 (0.55-1.36)	
Log-additive	---	0.83 (0.57-1.22)	0.35

Πίνακας 13 Συσχέτιση μεταξύ CD33 rs3865444 και ηλικίας έναρξης της νόσου του κινητικού νευρώνα). Όπου A: mutant allele και όπου C: wild type allele.

Γονότυπος	Μη σταθμισμένο μοντέλο		Σταθμισμένο για το φύλο	
	Hazard Ratio (95%CI)	p-value	Hazard Ratio (95%CI)	p-value
C/C	1.00		1.00	
C/A	0.88 (0.64, 1.23)	.46	0.84 (0.60, 1.17)	.30
A/A	0.72 (0.31, 1.64)	.43	0.73 (0.32, 1.67)	.46

Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη κατέληξε πως δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στους SNPs MOBP rs616147, CD33 rs3865444, και SCFD1 rs10139154 και στη NKN στον ελληνικό πληθυσμό, τόσο ως προς τον κίνδυνο όσο και ως προς την ηλικία νόσησης. Στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, οι SNPs MOBP rs616147 και SCFD1 rs10139154 είχαν συσχετιστεί με NKN στον δυτικό-ευρωπαϊκό και αμερικάνικο πληθυσμό αλλά όχι στον ασιατικό (μη σημαντικά αποτελέσματα), ενώ απουσίαζε πλήρως η διερεύνηση αυτών στον ελληνικό πληθυσμό. Από την άλλη, ο ρόλος του CD33 rs3865444 δεν είχε μελετηθεί καθόλου στη NKN – σε κανέναν πληθυσμό. Στηριζόμενοι στα αρνητικά αποτελέσματα των GWASs, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως έμμεσα προϋπήρχαν ενδείξεις για την απουσία συσχέτισης μεταξύ CD33 rs3865444 και NKN. Παρόλα αυτά σε σπάνιες νοσολογικές οντότητες όπως είναι η NKN, απαιτείται ένα εξαιρετικά μεγάλο μέγεθος δείγματος (που ίσως να μην είναι δυνατό να συγκεντρωθεί) για να αναγνωριστεί κάποιος χαμηλής συχνότητας SNP που συνεισφέρει μικρού μεγέθους κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου (224)

Η κληρονομικότητα έχει υπολογιστεί πως πιθανώς εξηγεί περισσότερο του 50% της διακύμανσης του συνολικού κινδύνου νόσησης από σποραδική NKN (38). Το σύνολο όμως των γονιδιακών τόπων που έχουν αναγνωριστεί στη βιβλιογραφία μέχρι και σήμερα δεν εξηγεί περισσότερο από 10% της διακύμανσης (38). Για τον λόγο αυτό ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας στο εν λόγω πεδίο, προσανατολίζεται ακόμη στη γενετική αρχιτεκτονική της νόσου. Η πλέον συνηθέστερη προσέγγισή δεν είναι άλλη από τις GWASs. Πλην όμως του προαναφερθέντος μειονεκτήματος των GWASs που αφορά στο μέγεθος του δείγματος, επιπλέον παράμετροι θέτουν περιορισμούς και πριμοδοτούν τη χρήση εναλλακτικών προσεγγίσεων σε ορισμένες συνθήκες (225).

Στην περίπτωση της NKN, μέχρι σήμερα η πλειονότητα των GWASs επικεντρώνεται στον δυτικό-ευρωπαϊκό, αμερικάνικο και κινεζικό πληθυσμό. Επομένως, η δυνατότητα

γενίκευσης (generalizability) των ευρημάτων είναι περιορισμένη. Διαφορετικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορετική σχετική συχνότητα αλληλόμορφων (variant representation) και διαφορετική ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium), και είναι κοινό μία ισχυρή γενετική συσχέτιση σε έναν πληθυσμό να απουσιάζει τελείως σε έναν άλλον (226). Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των GWASs σε άλλους πληθυσμούς είναι συνήθως αποδοτικότερη (λιγότερο εργώδης και με μικρότερο κόστος) η πραγματοποίηση candidate gene analyses (μελέτες υποψήφιων γονιδίων).

Οι γενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στη ΝΚΝ. Αναφορικά, μεταξύ άλλων, μεταλλάξεις στα γονίδια *C9ORF72*, *FUS*, *SOD1*, *TARDBP*, *ANXA11*, *CHMP2B*, *DCTN1*, *DNAJC7*, *DYNCL1H1*, *ERBB4*, *FIG 4*, *HNRNPA1*, *KIF5A*, *MATR3*, *NEFH*, *NEK1*, *OPTN*, *PFN1*, *SARM1*, *SCFD1*, *SETX*, *SIGMAR1*, *SPG11*, *SQSTM1*, *TBK1*, *TNIP1*, *TUBA4A*, *UBQLN2*, *UNC13A*, *VAPB*, *VCP*, έχουν ενοχοποιηθεί (227). Τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια μέσω των οποίων οι εν λόγω μεταλλάξεις υπεισέρχονται στην παθογένεση της νόσου είναι πολλά και ετερογενή. Ανά περίπτωση, φαίνεται να διαταράσσονται λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η οργάνωση της χρωματίνης, οι διαδικασίες επιδιόρθωσης και αντιγραφής του DNA, η γονιδιακή έκφραση, ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, η ανοσολογική απόκριση ή οι φλεγμονώδεις απαντήσεις, η μεταφορά μορίων εντός του κυτταροπλάσματος, η σηματοδότηση – επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, κ.α. Με την ανεύρεση νέων γενετικών συσχέτισεων, αναδεικνύονται συνεχώς επιπλέον παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί και είναι πλέον ξεκάθαρο πως ανεξαρτήτως του εναρκτήριου γεγονότος, ο παθογενετικός μηχανισμός της νόσου είναι δαιδαλώδης. Κατ' επέκταση, νέες υποψήφιες θεραπείες που στοχεύουν σε διαφορετικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια ή σε διαφορετικά σημεία κοινών μονοπατιών προκρίνονται συνεχώς (228).

Βασιζόμενοι τόσο σε δημοσιευμένες συσχετίσεις σε άλλους πληθυσμούς (MOBP rs616147, SCFD1 rs10139154) όσο και σε παθογενετικές υποθέσεις (CD33 rs3865444) αποφασίσαμε να επικεντρωθούμε στους τρεις προαναφερθέντες SNPs στον Ελληνικό πληθυσμό. Ο αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας πολυμορφισμός rs616147 (πιθανώς αποκλειστική ιδιότητα βιοδείκτη) βρίσκεται στο γονίδιο MOBP που παράγει την πρωτεΐνη MOBP η οποία θεωρείται δομικό συστατικό των ελύτρων μυελίνης και παράγεται από τα ολιγοδενδροκύτταρα (178). Από την άλλη πλευρά, ο παθογενετικός μηχανισμός της NKN αφορά πρωτίστως στην εκφύλιση των KN. Πως είναι δυνατόν να εξηγηθεί, λοιπόν, η συσχέτιση του MOBP rs616147 στον Δυτικό-Ευρωπαϊκό και Αμερικάνικο πληθυσμό?

Παρόλο που η εκφύλιση των KN αποτελεί το κεντρικό γεγονός της NKN, η νευρογλοία θεωρείται επίσης πολύ σημαντική για την παθογένεση της νόσου (229–231). Παράλληλα με την εκφύλιση των KN της φαιάς ουσίας, έχουν διαπιστωθεί εξίσου (ή και περισσότερο) εξέχουσες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις στη λευκή ουσία του ΚΝΣ (232). Οι διαταραχές της λευκής ουσίας φαίνεται να εγκαθίστανται στα αρχικά στάδια της νόσου, πριν την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων (233). Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων θεωρήθηκε εφικτό το σενάριο: παράγοντες που συνεισφέρουν στις διαδικασίες μυελίνωσης να υπεισέρχονται πρωτοπαθώς και στην παθογένεση της NKN (195). Οι παράγοντες αυτοί όμως είναι πιθανό να σχετίζονται με τη παθογένεση της NKN μέσω εναλλακτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν, πέραν των διεργασιών μυελίνωσης.

Παθολογοανατομικές αναλύσεις έχουν αναδείξει εκσεσημασμένες αλλαγές στη νευρογλοία που περιβάλλει τους εκφυλιζόμενους KN της ΣΣ, με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και υπερτροφία (197). Μεταξύ αυτών, έχει φανεί πως τα προγονικά κύτταρα NG2+ με δυνατότητα διαφοροποίησης σε ολιγοδενδροκύτταρα παρουσιάζουν ρυθμούς πολλαπλασιασμού συνεχώς αυξανόμενους με την πρόοδο της νόσου, υποσημαίνοντας την πιθανή εμπλοκή των ολιγοδενδροκυττάρων στη NKN (234,235). Σε διαγονιδιακά ζωικά

μοντέλα (τρωκτικά) με NKN λόγω SOD-1 μεταλλάξεων έχει διαπιστωθεί επιπλέον εκσεσημασμένη εκφύλιση των ολιγοδενδροκυττάρων στη φαιά ουσία του ΝΜ (196,197). Φαίνεται πως ο αυξανόμενος πολλαπλασιασμός των προγονικών NG2+ κυττάρων είναι αντιροπιστικός στον αυξημένο ρυθμό εκφύλισης αυτών, η αποτυχημένη όμως διαφοροποίηση των NG2+ κυττάρων (σε δυσλειτουργικά ολιγοδενδροκύτταρα), οδηγεί προοδευτικά σε απομυελίνωση (196,197). Πλην της καλά καθορισμένης συνδρομής των ολιγοδενδροκυττάρων στην παραγωγή μυελίνης, έχει φανεί πως η λειτουργία αυτών είναι πολύ κρίσιμη και για τη μεταβολική υποστήριξη των νευρώνων (236,237). Επομένως, βιοδείκτες αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας όπως ο MOBP rs616147 είναι πιθανό να αποτελούν ενδείξεις δυσλειτουργίας της ολιγοδενδρογλοίας παρά να υποσημαίνουν την άμεση συμμετοχή μηχανισμών απομυελίνωσης στη ΝΚΝ.

Όσον αφορά στον πολυμορφισμό rs10139154 του γονιδίου SCFD1, αποτελεί επίσης έναν αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας πολυμορφισμό η λειτουργία του οποίου είναι παρομοίως δυνατόν να περιορίζεται αποκλειστικά σε αυτή του βιοδείκτη. Είναι γνωστό πως το γονίδιο SCFD1 εμπλέκεται σε παθοφυσιολογικά μονοπάτια που υπεισέρχονται στην παθογένεση της ΝΚΝ: ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών, οξειδωτικό στρες, απόπτωση, κ.α. (202–204). Προηγούμενες μελέτες που έχουν ποσοτικοποιήσει τη γονιδιακή έκφραση του SCFD1 σε ασθενείς ΝΚΝ και υγιείς πάσχοντες έχουν επιβεβαιώσει τη συσχέτιση αυτού με την παρουσία αλλά και με άλλες παραμέτρους της νόσου (238). Παρόλα αυτά, δεδομένης της λαβυρινθώδους λειτουργίας του SCFD1, επιπλέον μελέτες απαιτούνται για να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός που μεσολαβεί τη συσχέτιση αυτού με τη ΝΚΝ, όπως επίσης τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού rs10139154 με τη ΝΚΝ.

Αντίθετα, η κλινική σημασία του CD33 rs3865444 έχει περιγραφεί σε ασθενείς με ν. Alzheimer και έγκειται σε μειωμένη έκφραση του CD33 στην επιφάνεια των μικρογλοιακών κυττάρων η οποία φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο φαγοκυτταρικό δυναμικό β-

αμυλοειδούς (προστατευτικός παράγοντας για ν. Alzheimer) (210,211). Παρομοίως, λόγω της επίδρασης του πολυμορφισμού στην ευόδωση μηχανισμών “προστατευτικής” φλεγμονώδους απόκρισης (τοπικής ομοιόστασης), εικάζεται πως ο CD33 rs3865444 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένο κίνδυνο νόσησης κι από άλλα νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Η δημοσιευμένη βιβλιογραφία έχει ήδη παρέχει αποτελέσματα συμβατά με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ν. Parkinson, ενώ πιθανώς ο CD33 rs3865444 υπεισέρχεται και στην παθογένεση της Πολλαπλής Σκλήρυνσης (212–215). Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένδειξη (genetic association analysis ή GWAS) που να προκρίνει τον ρόλο του εν λόγω SNP στη ΝΚΝ.

Η χαρτογράφηση της γονιδιακής αρχιτεκτονικής της ΝΚΝ αποτελεί ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο το οποίο όμως προς το παρόν βρίσκεται σε ένα πρώιμο στάδιο. Η δυσκολία ανακάλυψης του συνόλου των γενετικών καθοριστών της νόσου, πιθανώς αφορά στο λαβυρινθώδες γονιδιακό υπόβαθρο που μπορεί να περιλαμβάνει εκτός των άλλων συνδυασμούς γονιδιακών πολυμορφισμών με διαφορετική επίδραση στον συνολικό κίνδυνο της νόσου (239). Η δημοσιευμένη βιβλιογραφία συνηγορεί πως ένα κλάσμα των περιπτώσεων με ΝΚΝ παρουσιάζει περισσότερους από έναν εκ των γνωστών γονιδιακών καθοριστών, και η παρουσία αυτών παρουσιάζει μία σωρευτική επίδραση στον συνολικό κίνδυνο (240–242). Η αδυναμία των αναλυτικών προσεγγίσεων να ερμηνεύσει πλήρως τις λανθάνουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών γενετικών καθοριστών μπορεί να αντιπροσωπεύει ποσοστό της διακύμανσης του συνολικού γονιδιακού κινδύνου που δεν έχει καθοριστεί επαρκώς. Εκτός αυτού, η κληρονομικότητα μπορεί να είναι δύσκολο να εξηγηθεί επαρκώς σε περιπτώσεις οικογενούς ΝΚΝ που οφείλεται σε μεταλλάξεις με ατελή διεισδυτικότητα (πχ *C9ORF72*, παρουσία υγιών φορέων) (243) ή σε περιπτώσεις σποραδικής ΝΚΝ που οφείλεται σε υψηλής διεισδυτικότητας μονογονιδιακούς καθοριστές απουσία συμβατού οικογενειακού ιστορικού (244). Τέλος, ένα επιπλέον ποσοστό του κληρονομικά καθορισμένου κινδύνου μπορεί να ασκείται από εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας

αλληλόμορφα. Σε συνδυασμό με τον εξαιρετικά χαμηλό επιπολασμό της νόσου, η αποκάλυψη της σημασίας των ασυνήθιστων γονιδιακών παραλλαγών απαιτεί εξαιρετικά μεγάλα μεγέθη δείγματος για την επιβεβαίωση των εν λόγω συσχετίσεων.

Παράλληλα, είναι φρόνιμο να λάβουμε υπόψη τα μειονεκτήματα των μεθόδων γονοτύπησης που χρησιμοποιούνται στις γονιδιακές μελέτες. Οι GWASs (η πιο κοινή προσέγγιση) είναι κατά το πλείστον μελέτες πασχόντων μαρτύρων που γονοτυπών τους συμμετέχοντες για κοινά (γνωστά από τη βιβλιογραφία) SNPs. Επομένως, αυτού του τύπου οι μελέτες δε θα αποκαλύψουν συσχετίσεις για μεταλλάξεις – αλληλόμορφα που δεν περιλαμβάνονται στο πάνελ των αναλυόμενων αλληλόμορφων (225). Επιπρόσθετα, υπάρχουν κάποια θεωρητικά “αντιμετωπίσιμα” θέματα που εγείρονται στις GWASs (245). Βασικό ζήτημα αποτελούν οι πολλαπλές ταυτόχρονες συσχετίσεις που οδηγούν σε στατιστικές “ποινές” και ακυρώνουν ευρήματα χαμηλής ακρίβειας (ορισμένα εξ αυτών να αντιπροσωπεύουν αληθείς συσχετίσεις). Εξίσου σοβαρό θέμα συνιστά η ετερογενής γενετική διαστρωμάτωση μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών που συνδυάζονται στατιστικά (δηλαδή οι διαφορετικές σχετικές συχνότητες των αλληλίων), η οποία απαιτεί κατάλληλη αναλυτική διαχείριση ώστε να μην αποκρυφθούν αληθείς συσχετίσεις. Στα μειονεκτήματα των διαγνωστικών τεχνικών πρέπει, τέλος, να αναφέρουμε και τις αδυναμίες των μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενεάς. Εξ ορισμού η αλληλούχιση του συνόλου των εξονίων δεν είναι δυνατό να ανιχνεύσει σημαντικές μεταλλάξεις στο μη κωδικοποιό DNA (246,247). Από την άλλη πλευρά αυτό το μειονέκτημα αντιμετωπίζεται με την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος, παραμένει όμως η αδυναμία των μεθόδων αλληλούχισης να αναδείξουν ορισμένους τύπους μεταλλάξεων, πχ πολυπλοειδία, μοσαϊκισμός, δομική αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων, προσθήκη, απαλοιφή, αντιγραφή, επαναλήψεις, τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις, ιντρονικά αλληλόμορφα έξω από την περιοχή ματίσματος, κ.α. (248,249).

Περιορισμοί

Είναι δόκιμο να αναγνωρίσουμε πως η παρούσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, το μέγεθος του δείγματος εξασφάλισε μία ικανοποιητική ισχύ της τάξης του 80%. Παρόλα αυτά πρέπει να επισημάνουμε την υπάρχουσα πιθανότητα (σχεδόν 20%) η παρούσα μελέτη να απέτυχε να ανιχνεύσει μία πραγματική συσχέτιση μεταξύ των SNPs και της NKN. Επίσης, ενώ η εκδήλωση της νόσου ήταν σποραδική στις οικογένειες των ασθενών που μελετήθηκαν, οι ασθενείς δεν είχαν ελεγχθεί για την παρουσία των κοινών γονιδίων που σχετίζονται με οικογενή (και σε μικρότερη συχνότητα και με σποραδική) NKN: C9orf72, SOD 1, TDP-43 and FUS/TLS. Επιπλέον, οι συμμετέχοντες επιλέχθηκαν από μία γεωγραφικά περιορισμένη περιοχή και όχι από όλη την έκταση της ελληνικής επικράτειας. Η επιλογή γεωγραφικά περιορισμένων δειγμάτων υπερέχει ως προς το σχηματισμό συγκρίσιμων δειγμάτων (με παρόμοιες συχνότητες εκθέσεων σε άλλους παράγοντες κινδύνου, πχ έκθεση σε βαρέα μέταλλα και παρασιτοκτόνα αποδιδόμενη σε κατανάλωση τοπικών προϊόντων γεωργίας και νερού), εισάγει όμως ένα σφάλμα υπερεξομοίωσης στις γενετικές μελέτες (250). Αυτό το σφάλμα μεταφράζεται ως μία παρόμοια συχνότητα πολυμορφισμών στις δύο ομάδες που συγκρίνονται. Λαμβάνοντας υπόψη πως οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν αναμένεται να οδηγήσουν σε εκδήλωση NKN από μόνοι τους αλλά συνδράμουν στην πολυγονιδιακή αιτιολογία της NKN, ενδεχομένως να χρειαζόμαστε ένα μεγαλύτερο δείγμα ώστε να εντοπίσουμε πραγματικά σημαντικούς πολυμορφισμούς που συνεισφέρουν ένα μικρό σχετικά μέγεθος κινδύνου σε γενετικά συγκρίσιμες ομάδες πασχόντων - μαρτύρων. Εδώ είναι δόκιμο να επισημανθεί πως η γεωγραφική υπερεξομοίωση των δειγμάτων ενδέχεται να περιορίσει σημαντικά την αστάθμητη επίδραση συγχυτικών παραγόντων (residual confounding), δεν μπορεί να αποκλειστεί όμως η παρουσία ενός αστάθμητου παράγοντα που διαστρεβλώνει τα αποτελέσματα μας σημαντικά. Τέλος, η δυνατότητας γενίκευσης των ευρημάτων της μελέτης σε άτομα διαφορετικής εθνικής προέλευσης είναι περιορισμένη.

Συμπέρασμα

Η παρούσα μελέτη δεν κατάφερε να αναπαράγει τις συσχετίσεις των MOBP rs616147 και SCFD1 rs10139154 με τη NKN στον Ελληνικό πληθυσμό, ούτε να ανιχνεύσει κάποια σύνδεση μεταξύ CD33 rs3865444 και NKN. Η αναπαραγωγή των εν λόγω ευρημάτων σε μελλοντικές μελέτες που θα περιλαμβάνουν μεγαλύτερα και γεωγραφικά ευρύτερα δείγματα ατόμων ελληνικής εθνικότητας κρίνεται απαραίτητη. Η χαρτογράφηση της γενετικής αρχιτεκτονικής της NKN πρόκειται να διευρύνει τις γνώσεις μας τόσο πάνω στην παθοφυσιολογία και παθογένεση της νόσου, όσο και να πληροφορήσει την έρευνα πάνω στην θεραπεία της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jay V. The legacy of Jean-Martin Charcot. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jan;124(1):10–1.
2. Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clinical Medicine & Research.* 2011 Mar;9(1):46.
3. Lou Gehrig and the History of ALS [Internet]. The ALS Association. [cited 2022 Dec 2]. Available from: <https://www.als.org/understanding-als/lou-gehrig>
4. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Oct 5;3:17071.
5. Thakore N, Piro EP. Types of Motor Neuron Diseases. In: Johnston M Michael, Adams Jr. M Harold, Fatemi M MBA, Ali, editors. *Neurobiology of Disease*, 2nd edition. Oxford Academic, New York, 2016. <https://doi.org/10.1093/med/9780199937837.003.0022>
6. Lohia A, McKenzie J. Neuroanatomy, Pyramidal Tract Lesions. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540976/>
7. Natali AL, Reddy V, Bordoni B. Neuroanatomy, Corticospinal Cord Tract. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535423/>
8. Bhardwaj N, Yadala S. Neuroanatomy, Corticobulbar Tract. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555891/>
9. Javed K, Daly DT. Neuroanatomy, Lower Motor Neuron Lesion. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539814/>

10. Omar A, Marwaha K, Bollu PC. Physiology, Neuromuscular Junction. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470413/>
11. Emos MC, Agarwal S. Neuroanatomy, Upper Motor Neuron Lesion. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537305/>
12. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial 'Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis' workshop contributors. *J Neurol Sci.* 1994 Jul;124 Suppl:96–107.
13. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000 Dec;1(5):293–9.
14. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol.* 2008 Mar;119(3):497–503.
15. de Carvalho M. Does Awaji decrease diagnostic yield in ALS? *Muscle Nerve.* 2012 Jul;46(1):142–3; author reply 143-144.
16. Higashihara M, Sonoo M, Imafuku I, Fukutake T, Kamakura K, Inoue K, et al. Fasciculation potentials in amyotrophic lateral sclerosis and the diagnostic yield of the Awaji algorithm. *Muscle Nerve.* 2012 Feb;45(2):175–82.
17. Geevasinga N, Menon P, Scherman DB, Simon N, Yiannikas C, Henderson RD, et al. Diagnostic criteria in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter prospective study. *Neurology.* 2016 Aug 16;87(7):684–90.

18. Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui LY, de Carvalho M, Eisen A, et al. A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol.* 2020 Aug;131(8):1975–8.
19. Pugdahl K, Camdessanché JP, Cengiz B, de Carvalho M, Liguori R, Rossatto C, et al. Gold Coast diagnostic criteria increase sensitivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2021 Dec;132(12):3183–9.
20. Hannaford A, Pavey N, van den Bos M, Geevasinga N, Menon P, Shefner JM, et al. Diagnostic Utility of Gold Coast Criteria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol.* 2021 Dec;89(5):979–86.
21. Shen D, Yang X, Wang Y, He D, Sun X, Cai Z, et al. The Gold Coast criteria increases the diagnostic sensitivity for amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese population. *Transl Neurodegener.* 2021 Aug 9;10(1):28.
22. Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, et al. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* 2020 Apr;267(4):944–53.
23. Fontana A, Marin B, Luna J, Beghi E, Logroscino G, Boumédiene F, et al. Time-trend evolution and determinants of sex ratio in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a dose-response meta-analysis. *J Neurol.* 2021 Aug;268(8):2973–84.
24. Marin B, Fontana A, Arcuti S, Copetti M, Boumédiene F, Couratier P, et al. Age-specific ALS incidence: a dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2018 Jul;33(7):621–34.
25. Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat Commun.* 2016 Aug 11;7(1):12408.
26. Geevasinga N, Menon P, Özdinler PH, Kiernan MC, Vucic S. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol.* 2016 Nov;12(11):651–61.

27. van den Bos MAJ, Geevasinga N, Higashihara M, Menon P, Vucic S. Pathophysiology and Diagnosis of ALS: Insights from Advances in Neurophysiological Techniques. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 10;20(11):2818.
28. Eisen A, Kim S, Pant B. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): A phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve*. 1992 Feb;15(2):219–24.
29. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology*. 2004 Feb;185(2):232–40.
30. Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*. 1999 Jan;2(1):50–6.
31. Ravits J, Paul P, Jorg C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology*. 2007 Dec 8;68(19):1571–5.
32. Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci*. 2014 Aug;37(8):433–42.
33. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurologic Clinics*. 2015 Nov 1;33(4):855–76.
34. Mackenzie IR, Rademakers R. The role of transactive response DNA-binding protein-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Current Opinion in Neurology*. 2008 Dec;21(6):693.
35. Da Cruz S, Bui A, Saberi S, Lee SK, Stauffer J, McAlonis-Downes M, et al. Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. *Acta Neuropathol*. 2017 Jul 1;134(1):97–111.
36. Keller BA, Volkening K, Droppelmann CA, Ang LC, Rademakers R, Strong MJ. Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol*. 2012 Nov;124(5):733–47.

37. Smukowski SN, Maioli H, Latimer CS, Bird TD, Jayadev S, Valdmanis PN. Progress in Amyotrophic Lateral Sclerosis Gene Discovery: Reflecting on Classic Approaches and Leveraging Emerging Technologies. *Neurology Genetics*. 2022; 8(3): e669. doi: 10.1212/NXG.0000000000000669.
38. Zhang S, Cooper-Knock J, Weimer AK, Shi M, Moll T, Marshall JNG, et al. Genome-wide identification of the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. 2022 Mar 16;110(6):992-1008.e11.
39. Ryan M, Heverin M, McLaughlin RL, Hardiman O. Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2019 Nov 1;76(11):1367–74.
40. Hodge SE. Linkage analysis versus association analysis: distinguishing between two models that explain disease-marker associations. *Am J Hum Genet*. 1993 Aug;53(2):367–84.
41. Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *The Lancet Neurology*. 2018 Jan 1;17(1):94–102.
42. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Mar 4;362(6415):59–62.
43. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jul;88(7):540–9.
44. Berdyński M, Misztal P, Safranow K, Andersen PM, Morita M, Filipek S, et al. SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Sci Rep*. 2022 Jan 7;12(1):103.
45. Brown CA, Lally C, Kupelian V, Flanders WD. Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *NED*. 2021;55(5):342–53.

46. Opie-Martin S, Iacoangeli A, Topp SD, Abel O, Mayl K, Mehta PR, et al. The SOD1-mediated ALS phenotype shows a decoupling between age of symptom onset and disease duration. *Nat Commun.* 2022 Nov 12;13(1):6901.
47. Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, et al. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2008 Sep 19;4(9):e1000193.
48. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(5):572–4.
49. Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol.* 2008 Dec;7(5):409–16.
50. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1208–11.
51. Shang Y, Huang EJ. Mechanisms of FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research.* 2016 Sep 15;1647:65–78.
52. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1205–8.
53. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):257–68.

54. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245–56.
55. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012 Apr;11(4):323–30.
56. Siokas V, Stamati P, Pateraki G, Liampas I, Aloizou AM, Tsirelis D, et al. Analysis of SOD2 rs4880 Genetic Variant in Patients with Alzheimer’s Disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2022 Sep 21;44(10):4406–14.
57. Rikos D, Siokas V, Mentis AFA, Aloizou AM, Liampas I, Tsouris Z, et al. TREM2 R47H variant and risk for Alzheimer’s disease: assessment in a Greek population and updated meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2022 Dec 6;1–9.
58. Siokas V, Mouliou DS, Liampas I, Aloizou AM, Folia V, Zoupa E, et al. Analysis of ADORA2A rs5760423 and CYP1A2 rs762551 Genetic Variants in Patients with Alzheimer’s Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 19;23(22):14400.
59. van Rheenen W, van der Spek RAA, Bakker MK, van Vugt JJFA, Hop PJ, Zwamborn RAJ, et al. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nat Genet*. 2021 Dec;53(12):1636–48.
60. van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1043–8.
61. Nakamura R, Misawa K, Tohnai G, Nakatochi M, Furuhashi S, Atsuta N, et al. A multi-ethnic meta-analysis identifies novel genes, including ACSL5, associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Commun Biol*. 2020 Sep 23;3(1):1–9.

62. van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van Den Bosch L, et al. Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):29–31.
63. Chio A, Calvo A, Moglia C, Brunetti M, Chia R, Ding J, et al. Clinical Utility of Whole-Genome Sequencing in an ALS Cohort (2512). *Neurology*; 96 (15 Supplement). https://n.neurology.org/content/96/15_Supplement/2512
64. Bick D, Dimmock D. Whole exome and whole genome sequencing. *Curr Opin Pediatr.* 2011 Dec;23(6):594–600.
65. Eitan C, Siany A, Barkan E, Olender T, van Eijk KR, Moisse M, et al. Whole-genome sequencing reveals that variants in the Interleukin 18 Receptor Accessory Protein 3'UTR protect against ALS. *Nat Neurosci.* 2022 Apr;25(4):433–45.
66. Vinceti M, Fiore M, Signorelli C, Odone A, Tesauro M, Consonni M, et al. Environmental risk factors for amyotrophic lateral sclerosis: methodological issues in epidemiologic studies. *Ann Ig.* 2012;24(5):407–15.
67. Siokas V, Aloizou AM, Pateraki G, Liampas I, Mitsias PD, Bogdanos DP, et al. Chapter 21 - Toxicology of neurodegenerative diseases. In: Tsatsakis AM, editor. *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure.* Academic Press; Cambridge, Massachusetts, 2021. p. 247–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323852159000489>
68. Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Heiman-Patterson T, Lacomis D, Rana S, et al. Environmental and occupational risk factors for amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study. *Neurodegener Dis.* 2014;14(1):31–8.
69. Farace C, Fenu G, Lintas S, Oggiano R, Pisano A, Sabalic A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and lead: A systematic update. *Neurotoxicology.* 2020 Dec;81:80–8.

70. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E. Environmental Risk Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Umbrella Review and Critical Assessment of Current Evidence from Systematic Reviews and Meta-Analyses of Observational Studies. *Neuroepidemiology*. 2016;46(2):96–105.
71. Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J. Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health*. 2012;27(1):19–41.
72. Andrew A, Zhou J, Gui J, Harrison A, Shi X, Li M, et al. Pesticides applied to crops and amyotrophic lateral sclerosis risk in the U.S. *Neurotoxicology*. 2021 Dec;87:128–35.
73. Kamel F, Umbach DM, Bedlack RS, Richards M, Watson M, Alavanja MCR, et al. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2012 Jun;33(3):457–62.
74. McKay KA, Smith KA, Smertinaite L, Fang F, Ingre C, Taube F. Military service and related risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2021 Jan;143(1):39–50.
75. Wang MD, Little J, Gomes J, Cashman NR, Krewski D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*. 2017 Jul;61:101–30.
76. Feddermann-Demont N, Junge A, Weber KP, Weller M, Dvořák J, Tarnutzer AA. Prevalence of potential sports-associated risk factors in Swiss amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Behav*. 2017 Apr;7(4):e00630.
77. Filippini T, Fiore M, Tesauro M, Malagoli C, Consonni M, Violi F, et al. Clinical and Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Case-Control Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 30;17(3):857.

78. Reich-Slotky R, Andrews J, Cheng B, Buchsbaum R, Levy D, Kaufmann P, et al. Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2013 Apr 1;14(3):212–6.
79. Körner S, Hendricks M, Kollwe K, Zapf A, Dengler R, Silani V, et al. Weight loss, dysphagia and supplement intake in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): impact on quality of life and therapeutic options. *BMC Neurol*. 2013 Jul 12;13(1):84.
80. Johansen C. Exposure to Electromagnetic Fields and Risk of Central Nervous System Disease in Utility Workers. *Epidemiology*. 2000 Sep;11(5):539.
81. Li CY, Sung FC. Association between occupational exposure to power frequency electromagnetic fields and amyotrophic lateral sclerosis: A review. *American Journal of Industrial Medicine*. 2003;43(2):212–20.
82. Jalilian H, Najafi K, Khosravi Y, Rösli M. Amyotrophic lateral sclerosis, occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and electric shocks: a systematic review and meta-analysis. *Rev Environ Health*. 2021 Mar 26;36(1):129–42.
83. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov;9(11):617–28.
84. Walhout R, Verstraete E, van den Heuvel MP, Veldink JH, van den Berg LH. Patterns of symptom development in patients with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2018 Feb;19(1–2):21–8.
85. Turner MR, Wicks P, Brownstein CA, Massagli MP, Toronjo M, Talbot K, et al. Concordance between site of onset and limb dominance in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Aug;82(8):853–4.
86. Turner MR, Brockington A, Scaber J, Hollinger H, Marsden R, Shaw PJ, et al. Pattern of spread and prognosis in lower limb-onset ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 2010 Aug;11(4):369–73.

87. Chiò A, Moglia C, Canosa A, Manera U, D'Ovidio F, Vasta R, et al. ALS phenotype is influenced by age, sex, and genetics: A population-based study. *Neurology*. 2020 Feb 25;94(8):e802–10.
88. Chiò A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G, PARALS study group. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jul;82(7):740–6.
89. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009 Mar 24;72(12):1087–94.
90. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, Mitsumoto H, Rowland LP. Clinical features that distinguish PLS, upper motor neuron–dominant ALS, and typical ALS. *Neurology*. 2009 Jun 2;72(22):1948–52.
91. Shoesmith CL, Findlater K, Rowe A, Strong MJ. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis with respiratory onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Jun;78(6):629–31.
92. Fang T, Jozsa F, Al-Chalabi A. Nonmotor Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Int Rev Neurobiol*. 2017;134:1409–41.
93. Chiò A, Moglia C, Canosa A, Manera U, Vasta R, Brunetti M, et al. Cognitive impairment across ALS clinical stages in a population-based cohort. *Neurology*. 2019 Sep 3;93(10):e984–94.
94. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017 Dec;18(3–4):153–74.
95. Pender N, Pinto-Grau M, Hardiman O. Cognitive and behavioural impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2020 Oct;33(5):649–54.

96. Abrahams S, Leigh PN, Harvey A, Vythelingum GN, Gris  D, Goldstein LH. Verbal fluency and executive dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuropsychologia*. 2000;38(6):734–47.
97. Beeldman E, Raaphorst J, Klein Twennaar M, de Visser M, Schmand BA, de Haan RJ. The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Jun;87(6):611–9.
98. Lillo P, Mioshi E, Zoing MC, Kiernan MC, Hodges JR. How common are behavioural changes in amyotrophic lateral sclerosis? *Amyotroph Lateral Scler*. 2011 Jan;12(1):45–51.
99. Grossman AB, Woolley-Levine S, Bradley WG, Miller RG. Detecting neurobehavioral changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2007 Feb;8(1):56–61.
100. Witgert M, Salamone AR, Strutt AM, Jawaid A, Massman PJ, Bradshaw M, et al. Frontal-lobe mediated behavioral dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2010 Jan;17(1):103–10.
101. Beswick E, Forbes D, Hassan Z, Wong C, Newton J, Carson A, et al. A systematic review of non-motor symptom evaluation in clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2022 Jan 1;269(1):411–26.
102. Nash Y, Sitty M. Non-Motor Symptoms of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Multi-Faceted Disorder. *J Neuromuscul Dis*. 2021;8(4):699–713.
103. Merico A, Cavinato M. Autonomic dysfunction in the early stage of ALS with bulbar involvement. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011 Sep;12(5):363–7.
104. D W, I M, Mcf M, Tb W, J C, J OP. Multimodal assessment of autonomic dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *European journal of neurology [Internet]*. 2022 Mar [cited 2022 Dec 18];29(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34748270/>
105. Li HF, Wu ZY. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*. 2016 Feb 3;5(1):3.

106. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14;2012(3):CD001447.
107. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology.* 1996 Dec;47(6 Suppl 4):S233-241.
108. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Mar 3;330(9):585–91.
109. Bensimon G, Lacomblez L, Delumeau JC, Bejuit R, Truffinet P, Meininger V, et al. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2002 Dec;249(5):609–15.
110. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet.* 1996 Dec 25;347(9013):1425–31.
111. Radicava (edaravone) FDA Approval History [Internet]. *Drugs.com.* [cited 2022 Dec 17]. Available from: <https://www.drugs.com/history/radicava.html>
112. Witzel S, Maier A, Steinbach R, Grosskreutz J, Koch JC, Sarikidi A, et al. Safety and Effectiveness of Long-term Intravenous Administration of Edaravone for Treatment of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2022 Feb 1;79(2):121–30.
113. Gao M, Zhu L, Chang J, Cao T, Song L, Wen C, et al. Safety and Efficacy of Edaravone in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Drug Investig.* 2022 Dec 3;
114. Writing Group, Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2017 Jul;16(7):505–12.

115. Corcia P, Beltran S, Bakkouche SE, Couratier P. Therapeutic news in ALS. *Rev Neurol (Paris)*. 2021 Dec;177(5):544–9.
116. Anekar AA, Cascella M. WHO Analgesic Ladder. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Dec 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554435/>
117. Hobson EV, McDermott CJ. Supportive and symptomatic management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2016 Sep;12(9):526–38.
118. Ng L, Khan F, Young CA, Galea M. Symptomatic treatments for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jan 10;1(1):CD011776.
119. Kjældgaard AL, Pilely K, Olsen KS, Jessen AH, Lauritsen AØ, Pedersen SW, et al. Prediction of survival in amyotrophic lateral sclerosis: a nationwide, Danish cohort study. *BMC Neurology*. 2021 Apr 17;21(1):164.
120. Christensen PB, Højer-Pedersen E, Niels Bjørn Jensen MD. Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in 2 Danish counties. *Neurology*. 1990 Apr 1;40(4):600–600.
121. Kaufmann P, Levy G, Thompson JLP, DelBene ML, Battista V, Gordon PH, et al. The ALSFRS_r predicts survival time in an ALS clinic population. *Neurology*. 2005 Jan 11;64(1):38–43.
122. Su WM, Cheng YF, Jiang Z, Duan QQ, Yang TM, Shang HF, et al. Predictors of survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A large meta-analysis. *EBioMedicine*. 2021 Dec;74:103732.
123. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Body mass index and dietary intervention: implications for prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2014 Dec 15;340(1–2):5–12.

124. Tard C, Defebvre L, Moreau C, Devos D, Danel-Brunaud V. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis and their prognostic value. *Rev Neurol (Paris)*. 2017 Dec;173(5):263–72.
125. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(5–6):310–23.
126. Gagliardi D, Meneri M, Saccomanno D, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Diagnostic and Prognostic Role of Blood and Cerebrospinal Fluid and Blood Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 25;20(17):4152.
127. Verde F, Silani V, Otto M. Neurochemical biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2019 Oct;32(5):747–57.
128. Galvin M, Gaffney R, Corr B, Mays I, Hardiman O. From first symptoms to diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: perspectives of an Irish informal caregiver cohort—a thematic analysis. *BMJ Open*. 2017 Mar 20;7(3):e014985.
129. Singh N, Ray S, Srivastava A. Clinical Mimickers of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Conditions We Cannot Afford to Miss. *Ann Indian Acad Neurol*. 2018;21(3):173–8.
130. Reed DM, Kurland LT. Muscle Fasciculations in a Healthy Population. *Arch Neurol*. 1963 Oct;9:363–7.
131. Filippakis A, Jara J, Ventura N, Scala S, Scopa C, Ruthazer R, et al. A prospective study of benign fasciculation syndrome and anxiety. *Muscle Nerve*. 2018 Dec;58(6):852–4.
132. Blexrud MD, Windebank AJ, Daube JR. Long-term follow-up of 121 patients with benign fasciculations. *Ann Neurol*. 1993 Oct;34(4):622–5.
133. de Carvalho M, Swash M. Cramps, muscle pain, and fasciculations: not always benign? *Neurology*. 2004 Aug 24;63(4):721–3.
134. Fleet WS, Watson RT. From benign fasciculations and cramps to motor neuron disease. *Neurology*. 1986 Jul;36(7):997–8.

135. Yeh WZ, Dyck PJ, Berg LH van den, Kiernan MC, Taylor BV. Multifocal motor neuropathy: controversies and priorities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Feb 1;91(2):140–8.
136. Cats EA, van der Pol WL, Piepers S, Franssen H, Jacobs BC, van den Berg-Vos RM, et al. Correlates of outcome and response to IVIg in 88 patients with multifocal motor neuropathy. *Neurology*. 2010 Aug 31;75(9):818–25.
137. Kieseier BC, Mathey EK, Sommer C, Hartung HP. Immune-mediated neuropathies. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Oct 11;4(1):31.
138. Straver DCG, van Asseldonk JTH, Notermans NC, Wokke JHJ, van den Berg LH, Franssen H. Cold paresis in multifocal motor neuropathy. *J Neurol*. 2011 Feb;258(2):212–7.
139. Taylor BV, Wright RA, Harper CM, Dyck PJ. Natural history of 46 patients with multifocal motor neuropathy with conduction block. *Muscle Nerve*. 2000 Jun;23(6):900–8.
140. Nobile-Orazio E. Multifocal motor neuropathy. *J Neuroimmunol*. 2001 Apr 2;115(1–2):4–18.
141. Taylor BV, Gross L, Windebank AJ. The sensitivity and specificity of anti-GM1 antibody testing. *Neurology*. 1996 Oct;47(4):951–5.
142. Vucic S, Black KR, Chong PST, Cros D. Multifocal motor neuropathy: decrease in conduction blocks and reinnervation with long-term IVIg. *Neurology*. 2004 Oct 12;63(7):1264–9.
143. van Alfen N, van Engelen BGM. The clinical spectrum of neuralgic amyotrophy in 246 cases. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):438–50.
144. Van Eijk JJJ, Groothuis JT, Van Alfen N. Neuralgic amyotrophy: An update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Muscle Nerve*. 2016 Mar;53(3):337–50.
145. Vucic S, Black K, Baldassari LE, Tick Chong PS, Dawson KT, Cros D. Long-term effects of intravenous immunoglobulin in CIDP. *Clin Neurophysiol*. 2007 Sep;118(9):1980–4.

146. Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, et al. Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol*. 2010 Apr;257(4):621–9.
147. Pegat A, Boisseau W, Maisonobe T, Debs R, Lenglet T, Psimaras D, et al. Motor chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) in 17 patients: Clinical characteristics, electrophysiological study, and response to treatment. *J Peripher Nerv Syst*. 2020 Jun;25(2):162–70.
148. Alexander LN, Seward JF, Santibanez TA, Pallansch MA, Kew OM, Prevots DR, et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA*. 2004 Oct 13;292(14):1696–701.
149. Howard RS. Poliomyelitis and the postpolio syndrome. *BMJ*. 2005 Jun 4;330(7503):1314–8.
150. Breza M, Koutsis G. Kennedy’s disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease. *J Neurol*. 2019 Mar;266(3):565–73.
151. La Spada A. Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2023 Jan 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1333/>
152. Jokela ME, Udd B. Diagnostic Clinical, Electrodiagnostic and Muscle Pathology Features of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Mol Neurosci*. 2016 Mar;58(3):330–4.
153. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics*. 2015 Nov 1;33(4):831–46.
154. Salort-Campana E, Quijano-Roy S. Clinical features of spinal muscular atrophy (SMA) type 3 (Kugelberg-Welander disease). *Arch Pediatr*. 2020 Dec;27(7S):7S23–27S28.

155. Liewluck T, Saperstein DS. Progressive Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov;33(4):761–73.
156. Lamb YN. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs.* 2022 Feb;82(3):323–34.
157. Amezcua L. Progressive Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneap Minn).* 2022 Aug 1;28(4):1083–103.
158. Siger M. Magnetic Resonance Imaging in Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients : Review. *Clin Neuroradiol.* 2022 Sep;32(3):625–41.
159. Lallemand-Dudek P, Durr A. Clinical and genetic update of hereditary spastic paraparesis. *Rev Neurol (Paris).* 2021 Dec;177(5):550–6.
160. Hedera P. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2023 Jan 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>
161. Turner MR, Barohn RJ, Corcia P, Fink JK, Harms MB, Kiernan MC, et al. Primary lateral sclerosis: consensus diagnostic criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 Apr 1;91(4):373–7.
162. Fullam T, Statland J. Upper Motor Neuron Disorders: Primary Lateral Sclerosis, Upper Motor Neuron Dominant Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Hereditary Spastic Paraplegia. *Brain Sci.* 2021 May 11;11(5):611.
163. Naddaf E, Barohn RJ, Dimachkie MM. Inclusion Body Myositis: Update on Pathogenesis and Treatment. *Neurotherapeutics.* 2018 Oct;15(4):995–1005.
164. Callan A, Capkun G, Vasanthaprasad V, Freitas R, Needham M. A Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence Studies of Sporadic Inclusion Body Myositis. *J Neuromuscul Dis.* 2017;4(2):127–37.

165. Hilton-Jones D, Brady S. Diagnostic criteria for inclusion body myositis. *Journal of Internal Medicine*. 2016;280(1):52–62.
166. Findlay AR, Goyal NA, Mozaffar T. An overview of polymyositis and dermatomyositis. *Muscle Nerve*. 2015 Dec;51(5):638–56.
167. Sasaki H, Kohsaka H. Current diagnosis and treatment of polymyositis and dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2018 Nov;28(6):913–21.
168. Huang Q, Li F, Zhao S. Spotlight on MuSK positive myasthenia gravis: clinical characteristics, treatment and outcomes. *BMC Neurology*. 2022 Mar 4;22(1):73.
169. Rodolico C, Bonanno C, Toscano A, Vita G. MuSK-Associated Myasthenia Gravis: Clinical Features and Management. *Front Neurol*. 2020 Jul 23;11:660.
170. Barp A, Ada Sansone V, Lunetta C. Challenges in diagnosis of motor neuron disease: A case series of ALS mimic syndromes. *Rev Neurol (Paris)*. 2021 Jun;177(6):699–706.
171. Ghasemi M. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes. *Iran J Neurol*. 2016 Apr 3;15(2):85–91.
172. Lenglet T, Camdessanché JP. Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2017 Dec;173(5):280–7.
173. Butler JM. Chapter 12 - Single Nucleotide Polymorphisms and Applications. In: Butler JM, editor. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2012 [cited 2023 Apr 5]. p. 347–69. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745132000129>
174. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002 May 15;34(3):275–305.
175. Vallejos-Vidal E, Reyes-Cerpa S, Rivas-Pardo JA, Maisey K, Yáñez JM, Valenzuela H, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) Mining and Their Effect on the

- Tridimensional Protein Structure Prediction in a Set of Immunity-Related Expressed Sequence Tags (EST) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Genetics*. 2020; 10: 1406. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.01406>
176. Chauhan W, Fatma R, Wahab A, Afzal M. Cataloging the potential SNPs (single nucleotide polymorphisms) associated with quantitative traits, viz. BMI (body mass index), IQ (intelligence quotient) and BP (blood pressure): an updated review. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2022 Mar 8;23(1):57.
177. Wondji CS, Hemingway J, Ranson H. Identification and analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. *BMC Genomics*. 2007 Jan 4;8(1):5.
178. PubChem. MOBP - myelin associated oligodendrocyte basic protein (human) [Internet]. [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/MOBP/human>
179. Yoshikawa H. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein modulates the arrangement of radial growth of the axon and the radial component of myelin. *Med Electron Microsc*. 2001 Sep;34(3):160–4.
180. Yamamoto Y, Yoshikawa H, Nagano S, Kondoh G, Sadahiro S, Gotow T, et al. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein is essential for normal arrangement of the radial component in central nervous system myelin. *Eur J Neurosci*. 1999 Mar;11(3):847–55.
181. Montague P, McCallion AS, Davies RW, Griffiths IR. Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein: A Family of Abundant CNS Myelin Proteins in Search of a Function. *DNE*. 2006;28(6):479–87.
182. Dulamea AO. Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. In: Asea AAA, Geraci F, Kaur P, editors. *Multiple Sclerosis: Bench to Bedside: Global Perspectives on a Silent Killer* Cham: Springer

International Publishing; 2017. vol 958, p. 91–127. (Advances in Experimental Medicine and Biology). https://doi.org/10.1007/978-3-319-47861-6_7

183. Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, Sleiman PMA, Wang LS, Klei L, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet.* 2011 Jul;43(7):699–705.

184. Irwin DJ, McMillan CT, Suh E, Powers J, Rascovsky K, Wood EM, et al. Myelin oligodendrocyte basic protein and prognosis in behavioral-variant frontotemporal dementia. *Neurology.* 2014 Aug 5;83(6):502–9.

185. Kaye JF, Rosbo NK de, Mendel I, Flechter S, Hoffman M, Yust I, et al. The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS). *Journal of Neuroimmunology.* 2000 Jan 24;102(2):189–98.

186. Holz A, Bielekova B, Martin R, Oldstone MBA. Myelin-Associated Oligodendrocytic Basic Protein: Identification of an Encephalitogenic Epitope and Association with Multiple Sclerosis1. *The Journal of Immunology.* 2000 Jan 15;164(2):1103–9.

187. Liu QY, Yu JT, Miao D, Ma XY, Wang HF, Wang W, et al. An exploratory study on STX6, MOBP, MAPT, and EIF2AK3 and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 2013 May 1;34(5):1519.e13-1519.e17.

188. Allen M, Burgess JD, Ballard T, Serie D, Wang X, Younkin CS, et al. Gene expression, methylation and neuropathology correlations at progressive supranuclear palsy risk loci. *Acta Neuropathol.* 2016 Aug 1;132(2):197–211.

189. Kon T, Tanji K, Mori F, Kimura A, Kakita A, Wakabayashi K. Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies. *Neuropathology.* 2019;39(4):279–85.

190. Sanchez-Contreras MY, Kouri N, Cook CN, Serie DJ, Heckman MG, Finch NA, et al. Replication of progressive supranuclear palsy genome-wide association study identifies *SLCO1A2* and *DUSP10* as new susceptibility loci. *Molecular Neurodegeneration*. 2018 Jul 9;13(1):37.
191. Chen Z, Chen JA, Shatunov A, Jones AR, Kravitz SN, Huang AY, et al. Genome-wide survey of copy number variants finds *MAPT* duplications in progressive supranuclear palsy. *Movement Disorders*. 2019;34(7):1049–59.
192. Yokoyama JS, Karch CM, Fan CC, Bonham LW, Kouri N, Ross OA, et al. Shared genetic risk between corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*. 2017 May 1;133(5):825–37.
193. Kouri N, Ross OA, Dombroski B, Younkin CS, Serie DJ, Soto-Ortolaza A, et al. Genome-wide association study of corticobasal degeneration identifies risk variants shared with progressive supranuclear palsy. *Nat Commun*. 2015 Jun 16;6(1):7247.
194. Niebroj-Dobosz I, Rafałowska J, Fidziańska A, Gadamski R, Grieb P. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in *SOD1G93A* transgenic rats. *Folia Neuropathol*. 2007;45(4):236–41.
195. Zhou T, Ahmad TK, Gozda K, Truong J, Kong J, Namaka M. Implications of white matter damage in amyotrophic lateral sclerosis (Review). *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):4379–92.
196. Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, et al. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2013 Feb;136(Pt 2):471–82.
197. Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, et al. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2013 May;16(5):571–9.

198. rs616147 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [cited 2023 Apr 5]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs616147#frequency_tab
199. Siokas V, Aloizou AM, Liampas I, Bakirtzis C, Tsouris Z, Sgantzios M, et al. Myelin-associated oligodendrocyte basic protein rs616147 polymorphism as a risk factor for Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2022 Feb;145(2):223–8.
200. Benyamin B, He J, Zhao Q, Gratten J, Garton F, Leo PJ, et al. Cross-ethnic meta-analysis identifies association of the GPX3-TNIP1 locus with amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun*. 2017 Sep 1;8(1):611.
201. rs10139154 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs10139154>
202. PubChem. SCFD1 - sec1 family domain containing 1 (human) [Internet]. [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/SCFD1/human>
203. Rizo J, Südhof TC. Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Aug;3(8):641–53.
204. Hou N, Yang Y, Scott IC, Lou X. The Sec domain protein Scfd1 facilitates trafficking of ECM components during chondrogenesis. *Developmental Biology*. 2017 Jan 1;421(1):8–15.
205. Chen Y, Zhou Q, Gu X, Wei Q, Cao B, Liu H, et al. An association study between SCFD1 rs10139154 variant and amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese cohort. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2018 Aug;19(5–6):413–8.
206. Stamati P, Siokas V, Aloizou AM, Karampinis E, Arseniou S, Rakitskii VN, et al. Does SCFD1 rs10139154 Polymorphism Decrease Alzheimer's Disease Risk? *J Mol Neurosci*. 2019 Oct;69(2):343–50.
207. rs3865444 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [cited 2022 Dec 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3865444#publications>

208. Cao H, Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology*. 2011;132(1):18–26.
209. Siokas V, Aslanidou P, Aloizou AM, Peristeri E, Stamati P, Liampas I, et al. Does the CD33 rs3865444 Polymorphism Confer Susceptibility to Alzheimer's Disease? *J Mol Neurosci*. 2020 Jun 1;70(6):851–60.
210. Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, et al. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci*. 2013 Aug 14;33(33):13320–5.
211. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*. 2013 Dec 22;78(4):631–43.
212. Siokas V, Arseniou S, Aloizou AM, Tsouris Z, Liampas I, Sgantzios M, et al. CD33 rs3865444 as a risk factor for Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2021 Mar 23;748:135709.
213. Javor J, Ďurmanová V, Párnická Z, Minárik G, Králová M, Pečeňák J, et al. Association of CD33 rs3865444:C>A polymorphism with a reduced risk of late-onset Alzheimer's disease in Slovaks is limited to subjects carrying the APOE ε4 allele. *Int J Immunogenet*. 2020 Oct;47(5):397–405.
214. Siokas V, Tsouris Z, Aloizou AM, Bakirtzis C, Liampas I, Koutsis G, et al. Multiple Sclerosis: Shall We Target CD33? *Genes (Basel)*. 2020 Nov 12;11(11):1334.
215. Javor J, Bucová M, Ďurmanová V, Radošinská D, Párnická Z, Čierny D, et al. Alzheimer's Disease Risk Variant rs3865444 in the CD33 Gene: A Possible Role in Susceptibility to Multiple Sclerosis. *Life (Basel)*. 2022 Jul 21;12(7):1094.
216. Arneson D, Zhang Y, Yang X, Narayanan M. Shared mechanisms among neurodegenerative diseases: from genetic factors to gene networks. *J Genet*. 2018 Jul;97(3):795–806.

217. Siokas V, Kardaras D, Aloizou AM, Liampas I, Papageorgiou E, Drakoulis N, et al. CYP1A2 rs762551 and ADORA2A rs5760423 Polymorphisms in Patients with Blepharospasm. *J Mol Neurosci*. 2020 Sep;70(9):1370–5.
218. Siokas V, Aloizou AM, Tsouris Z, Liampas I, Liakos P, Calina D, et al. ADORA2A rs5760423 and CYP1A2 rs762551 Polymorphisms as Risk Factors for Parkinson’s Disease. *J Clin Med*. 2021 Jan 20;10(3):381.
219. Ensembl genome browser 109 [Internet]. [cited 2023 Apr 6]. Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>
220. Siokas V, Karampinis E, Aloizou AM, Mentis AFA, Liakos P, Papadimitriou D, et al. CYP1A2 rs762551 polymorphism and risk for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci*. 2021 Jan;42(1):175–82.
221. Siokas V, Aloizou AM, Liampas I, Tsouris Z, Mentis AFA, Nasios G, et al. Lack of association between TREM2 rs75932628 variant and amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Biol Rep*. 2021 Mar;48(3):2601–10.
222. Liampas I, Siokas V, Aloizou AM, Bakirtzis C, Tsouris Z, Nousia A, et al. MOBP rs616147 Polymorphism and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a Greek Population: A Case-Control Study. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Dec 7;57(12):1337.
223. Siokas V, Aloizou AM, Liampas I, Bakirtzis C, Nasios G, Paterakis K, et al. Lack of an association between SCFD1 rs10139154 polymorphism and amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med Rep*. 2022 Apr;25(4):146.
224. Rich KA, Roggenbuck J, Kolb SJ. Searching Far and Genome-Wide: The Relevance of Association Studies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*. 2021; 14: 603023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.603023>
225. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2019 Aug;20(8):467–84.

226. Slatkin M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun;9(6):477–85.
227. Shatunov A, Al-Chalabi A. The genetic architecture of ALS. *Neurobiology of Disease.* 2021 Jan 1;147:105156.
228. Amado DA, Davidson BL. Gene therapy for ALS: A review. *Mol Ther.* 2021 Dec 1;29(12):3345–58.
229. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci.* 2008 Mar;11(3):251–3.
230. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1389–92.
231. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 2003 Oct 3;302(5642):113–7.
232. Rafałowska J, Dziejulska D. White matter injury in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Folia Neuropathol.* 1996;34(2):87–91.
233. Sach M, Winkler G, Glauche V, Liepert J, Heimbach B, Koch MA, et al. Diffusion tensor MRI of early upper motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2004 Feb;127(Pt 2):340–50.
234. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron.* 2010 Nov 18;68(4):668–81.
235. Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, Pardo AC, Lepore AC, et al. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia.* 2008 Jan 15;56(2):200–8.

236. Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):244–52.
237. Nave KA, Trapp BD. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:535–61.
238. Iacoangeli A, Fogh I, Selvackadunco S, Topp SD, Shatunov A, van Rheenen W, et al. SCFD1 expression quantitative trait loci in amyotrophic lateral sclerosis are differentially expressed. *Brain Commun*. 2021 Oct 7;3(4):fcab236.
239. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci*. 2019 Dec 6;13:1310.
240. Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM, et al. Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Ann Neurol*. 2015 Jan;77(1):100–13.
241. Morgan S, Shatunov A, Sproviero W, Jones AR, Shoai M, Hughes D, et al. A comprehensive analysis of rare genetic variation in amyotrophic lateral sclerosis in the UK. *Brain*. 2017 Jun 1;140(6):1611–8.
242. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. 2011 Dec 26;476(7359):220–3.
243. Murphy NA, Arthur KC, Tienari PJ, Houlden H, Chiò A, Traynor BJ. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep*. 2017 Dec 18;7(1):2116.
244. Al-Chalabi A, Lewis CM. Modelling the effects of penetrance and family size on rates of sporadic and familial disease. *Hum Hered*. 2011;71(4):281–8.
245. Pearson TA, Manolio TA. How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA*. 2008 Mar 19;299(11):1335–44.

246. Souche E, Beltran S, Brosens E, Belmont JW, Fossum M, Riess O, et al. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2022 Sep;30(9):1017–21.
247. Burdick KJ, Cogan JD, Rives LC, Robertson AK, Koziura ME, Brokamp E, et al. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A.* 2020 Jun;182(6):1400–6.
248. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genetics.* 2017 Feb 14;18(1):14.
249. Barrell B. DNA sequencing: present limitations and prospects for the future. *The FASEB Journal.* 1991;5(1):40–5.
250. Marsh JL, Hutton JL, Binks K. Removal of radiation dose response effects: an example of over-matching. *BMJ.* 2002 Aug 10;325(7359):327–30.