

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



Lek. Agnieszka Kinga Wetnicka-Wesołowska

***MARKERY ZAPALNE KRWI OBWODOWEJ A WYBRANE
NEUROTROFINY PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W
PATOGENEZIE STWARDNIENIA ZANIKOWEGO BOCZNEGO***

***INFLAMMATORY MARKERS OF PERIPHERAL BLOOD AND
SELECTED CEREBROSPINAL FLUID NEUROTROPHINS IN
THE PATHOGENESIS OF AMYOTROPHIC LATERAL
SCLEROSIS***

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki o medycynie

Promotor: *Dr hab. n. med. Monika Gołąb-Janowska*

Szczecin 2024r.

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Pani Dr hab. n. med. Monice Gołąb-Janowskiej, promotorowi, za cierpliwość, wyrozumiałość, każdą najmniejszą poprawkę przy tworzeniu pracy i za ogrom włożonego w nią serca,

Panu Prof. dr hab. n. med. Przemysławowi Nowackiemu za niezwykłą życzliwość, cierpliwość, zawsze cenne uwagi oraz wsparcie w trakcie realizacji tej pracy,

Zespołowi Zakładu Patologii Ogólnej PUM, ze szczególnym uwzględnieniem Pana Prof. dr hab. n. med. Bogusława Machalińskiego, Pani Prof. dr hab. n. med. Edyty Paczkowskiej oraz Pani Dr hab. n. med. Karoliny Łuczowskiej za nieocenione wsparcie merytoryczne, udostępnienie warsztatu naukowego i umożliwienie wykonania prezentowanych w pracy badań,

Zespołowi Kliniki Neurologii PUM za pomoc przy zbieraniu materiału badawczego.

Dziękuję także Mojej Córcie, Mojemu Mężowi i Moim Rodzicom za motywację, uśmiech i czas.

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	7
1 WSTĘP.....	13
1.1.1 Epidemiologia.....	17
1.1.2 Obraz kliniczny choroby	18
1.1.2.1 KRYTERIA ROZPOZNANIA	18
1.1.2.2 OBJAWY	23
1.1.2.3 WARIANTY	25
1.1.3 Patogeneza	26
1.1.3.1 PATOGENEZA – GENY GŁÓWNE.....	26
1.1.3.1.1 Gen <i>C9ORF72</i> (9p21)	27
1.1.3.1.2 Gen <i>SOD1</i> (21q22.1).....	28
1.1.3.1.3 Gen <i>TARDBP</i> – białko TDP-43 (1p36.22).....	30
1.1.3.1.4 Gen <i>FUS</i> (<i>ang. fused in sarcoma</i> ; 16p11.2).....	31
1.1.3.2 GENY I ICH DZIAŁANIE NA POZIOMIE MOLEKULARNYM	32
1.1.3.3. ZAPALENIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO.....	38
1.1.3.4 CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE	44
1.1.3.4.1 Wirusy	44
1.1.3.4.2 Toksyny.....	45
1.1.3.4.3 Metale.....	46
1.1.3.4.4 Inne czynniki	47

1.1.3.5 PATOGENEZA - PODSUMOWANIE	47
1.2 BADANE MARKERY ZAPALNE KRWI OBWODOWEJ.....	48
1.2.1 Białko C-reaktywne (CRP).....	48
1.2.2 Fibrynogen.....	49
1.2.3 Leukocyty	51
1.2.3.1 NEUTROFILE.....	52
1.2.3.2 LIMFOCYTY	53
1.2.3.3 WSKAŹNIK NEUTROFILOWO-LIMFOCYTOWY	55
1.3 BADANE MARKERY PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO.....	55
1.3.1 Czynniki wzrostu nerwów	57
1.3.2 Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego	59
1.3.3 Neurotrofina 3.....	62
1.3.4 Czynniki martwicy nowotworów alfa (<i>ang. tumor necrosis factor alpha</i> , TNF- alfa) i receptor czynnika martwicy nowotworów (<i>ang. TNF receptor</i> , TNFR)	64
2 CEL PRACY	69
3. MATERIAŁ I METODY	70
3.1 GRUPA BADANA	70
3.2 GRUPA KONTROLNA	72
3.3 BADANIA KRWI.....	73
3.4 BADANIA PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO	74
3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA.....	75
4. WYNIKI.....	77

4.1 CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA I DEMOGRAFICZNA GRUP.....	77
4.2 CHARAKTERYSTYKA LABORATORYJNA GRUP.....	79
4.3 ZWIĄZEK POMIĘDZY PARAMETRAMI ZAPALNYMI KRWI OBWODOWEJ A WYBRANYMI NEUROTROFINAMI I STĘŻENIEM CRP W PŁYNIU MÓZGOWO-RDZENIOWYM	82
4.4 ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY PARAMETRAMI KRWI/PŁYNU MÓZGOWO- RDZENIOWEGO A STANEM FUNKCJONALNYM CHORYCH Z ALS.....	91
5. DYSKUSJA	96
5.1 ZWIĄZKI MIĘDZY OCENIANYMI PARAMETRAMI KRWI I PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO.....	96
5.2 PORÓWNANIE PARAMETRÓW PACJENTÓW I OSÓB ZDROWYCH.....	100
5.2.1 Leukocyty	100
5.2.2 Białko C-reaktywne.....	103
5.2.3 Fibrynogen.....	104
5.2.4 Neurotrofiny	105
5.2.5 Czynn timer martwicy nowotworów	108
5.3 WPŁYW BADANYCH CZYNNIKÓW NA OBRAZ CHOROBY	109
5.4 DODATKOWE WYNIKI.....	111
6. OGRANICZENIA PRACY.....	112
7. WNIOSKI	113
8. STRESZCZENIE.....	114
9. ABSTRACT.....	116

10. SPIS TABEL.....	118
11. SPIS RYCIN.....	119
12. ZAŁĄCZNIKI.....	121
Załącznik nr 1.....	121
Załącznik nr 2.....	125
Załącznik nr 3.....	127
13. PIŚMIENNICTWO	138

Wykaz stosowanych skrótów

AD – choroba Alzheimerera, ang. *Alzheimer's disease*

AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności, ang. *acquired immunodeficiency syndrome*

ALS – stwardnienie zanikowe boczne, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*

ALSAQ-40 – Kwestionariusz Oceny Stwardnienia Zanikowego Bocznoego, ang. *ALS assessment questionnaire-40*

ALSFRS-R - Skorygowana Funkcjonalna Skala Stwardnienia Zanikowego Bocznoego, ang. *ALS Functional Rating Scale - Revised*

AMPA – receptor, ang. *α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate*

ATP – adozynotrifosforan, ang. *adenosine triphosphate*

ATPR – receptor ATP

BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego, ang. *brain-derived neurotrophic factor*

BiPAP - dwupoziomowe dodatnie ciśnienie w drogach oddechowych, ang. *Bilevel Positive Airway Pressure*

BMAA - β -metyloamino-L-alanina

BMI – wskaźnik masy ciała, ang. *body mass index*

C9orf72 – białko, ang. *chromosome 9 open reading frame 72*

CCNF – gen, ang. *cyclin F*

CD – antygen różnicowania komórkowego, ang. *cluster of differentiation*

CHMP2B – gen, ang. *charged multivesicular body protein 2B*

CRP – białko C-reaktywne, ang. *C-reactive protein*

DAM – mikroglej związany z chorobą, ang. *disease-associated microglia*

DAMP(s) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem, ang. *damage-associated molecular patterns*

DAO – gen, ang. *D-amino acid oxidase*

DaT- SCAN – skan gęstości transportera dopaminy, ang. *Dopamine Transporter Scan*

DCTN1 – gen, ang. *dynactin subunit 1*

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy, ang. *deoxyribonucleic acid*

DNR – dolny neuron ruchowy

DPR – białka z powtórzeniami dipeptydowymi, ang. *dipeptide repeat proteins*

EAAT2 – gen, ang. *excitatory amino acid transporter 2*

EBV – wirus Ebsteina-Barr, ang. *Epstein-Barr virus*

EDSS – rozszerzona skala niepełnosprawności, ang. *extended disability status scale*

EMG - elektromiografia

EPHA4 – gen, ang. *ephrin receptor A4*

ERBB4 – gen, ang. *erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*

Et al. – i inni, łac. *et alia*

EWSR – gen, ang. *Ewing sarcoma RNA Binding Protein*

fALS – rodzinna postać ALS, ang. *familial ALS*

FDA – Agencja Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*

FET – rodzina białek FET (nazwa od pierwszych liter białek należących do rodziny)

FGF-1 – czynnik wzrostu fibroblastów 1, ang. *fibroblast growth factor 1*

FIE – zapalenie mózgu i rdzenia wywołane przez fibrynę, ang. *fibrin-induced encephalomyelitis*

FIG4 – gen, ang. *Factor-Induced Gene 4 phosphoinositide 5-phosphatase*

FTD – otępienie czołowo-skroniowe, ang. *frontotemporal dementia*

FUS – gen/białko, ang. *fused in sarcoma*

GDNF – czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych, ang. *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GLT-1 – transporter glutaminianu 1, ang. *glutamate transporter-1*

GNR – górny neuron ruchowy

HERV-K – ludzki endogenny retrowirus K, ang. *human endogenous retrovirus K*

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności, ang. *human immunodeficiency virus*

HSV – wirus opryszczki pospolitej, ang. *herpes simplex virus*

IFCN – Międzynarodowa Federacja Neurofizjologii Klinicznej, ang. *International Federation of Clinical Neurophysiology*

IFN γ – interferon gamma

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu-1, ang. *insulin-like growth factor 1*

IL – interleukina

LDAM – mikroglej gromadzący kropelki lipidów, ang. *lipid-droplet-accumulating microglia*

LPS – lipopolisacharyd

MDA – dialdehyd malonowy, ang. *malondialdehyde*

MFI – średnia intensywność fluorescencji, ang. *mean fluorescence intensity*

MHC – główny układ zgodności tkankowej, ang. *major histocompatibility complex*

MIMS – mikroglej związany ze stanem zapalnym w stwardnieniu rozsianym, ang. *microglia inflamed in multiple sclerosis*

MND – choroba neuronu ruchowego, ang. *motor neuron disease*

mRNA – matrycowe RNA

MS – stwardnienie rozsiane, ang. *multiple sclerosis*

NET - zewnętrzkomórkowe pułapki neutrofilowe, ang. *neutrophil extracellular traps*

NFH – gen, ang. *neurofilament heavy chain*

NF-kB – jądrowy czynnik kappa-B, ang. *nuclear factor kappa-B*

NGF – czynnik wzrostu nerwów, ang. *nerve growth factor*

NK – limfocyty/komórki NK, ang. *natural killer*

NKT – limfocyty/komórki NKT, ang. *natural killer-T*

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

NLR – wskaźnik neutrofilowo-limfocytowy, ang. *neutrophil to lymphocyte ratio*

NMDA – receptor, ang. *N-methyl-D-aspartate*

NO – tlenek azotu

NT – neurotrofiny

NT-3 – neurotrofina 3

OPTN – gen, ang. *optineurin*

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

p – istotność statystyczna

p75 – receptor z grupy receptorów TNF

PAMP(s) – wzorce molekularne związane z patogenem, ang. *pathogen-associated molecular patterns*

PB – fenylomaślan sodu

PBP – postępujące porażenie opuszki, ang. *progressive bulbar palsy*

PD – choroba Parkinsona, ang. *Parkinson's disease*

PFN1 – gen, ang. *profilin 1*

pkt – punkt

PLS – pierwotne stwardnienie boczne, ang. *primary lateral sclerosis*

PMA – postępujący zanik mięśni, ang. *progressive muscular atrophy*

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

proBDNF – białko prekursorowe neurotroficznego czynnika pochodzenia
mózgowego

proNGF – białko prekursorowe czynnika wzrostu nerwów

proNT – proneurotrofiny

QoL – jakość życia, ang. *quality of life*

R – współczynnik korelacji Spearmana

RBP – regulatorowe białka wiążące RNA, ang. *RNA binding proteins*

reg. - region

RNA – kwas rybonukleinowy, ang. *ribonucleic acid*

ROS – reaktywne formy tlenu

RSV – syncytialny wirus oddechowy, ang. *respiratory syncytial virus*

sALS – sporadyczna postać ALS, ang. *sporadic ALS*

SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, ang.
severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SCL1A2 – gen, ang. *solute carrier family 1 member 2*

SMA – rdzeniowy zanik mięśni, ang. *spinal muscular atrophy*

SOD1 – dysmutaza ponadtlenkowa 1, ang. *superoxide dysmutase 1*

SQSTM1 – gen, ang. *sequestosome 1*

TAF15 – gen, ang. *TATA-box binding protein associated factor 15*

TARDBP – gen, ang. *trans-activation response DNA-binding protein*

TBC – domena białkowa, nazwa od pierwszych liter białek ją zawierających

Tbc1d1 – białko, ang. *TBC1 domain family member 1*

TBK1 – gen, ang. TANK-Binding Kinase 1

TDP-43 – białko, ang. *TAR DNA-binding protein 43*

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta, ang. *transforming growth factor β*

Th – limfocyt (komórka) T typu pomocniczego, ang. *T helper*

TLR – receptor typu toll

TNF α – czynnik martwicy nowotworów alfa, ang. *tumor necrosis factor alpha*

TNFR1 – receptor TNF typu 1

TNFR2 – receptor TNF typu 2

Trk receptor – receptor z kinazą związaną z tropomiozyną

TrkA – receptor Trk typu A

TrkB – receptor Trk typu B

TrkB.FL – pełnej długości forma receptora Trk typu B

TrkB.T1 i TrkB.T2 – skrócone formy receptora Trk typu B

TrkC – receptor Trk typu C

TrkC.T1 i TrkC.T2 – skrócone formy receptora Trk typu C

TUDCA – kwas tauroursodeoksycholowy

UBQLN2 – gen, ang. *ubiquilin 2*

WFN – Światowa Federacja Neurologii, ang. *World Federation of Neurology*

VAPB – gen, ang. *vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C*

VCP – gen, ang. *valosin containing protein*

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, ang. *vascular endothelial growth factor*

1 WSTĘP

Choroby neuronu ruchowego (*ang. motor neurone disease, MND*) to grupa schorzeń o szerokim spektrum objawów klinicznych i zróżnicowanej etiologii, cechujących się postępującym zwyrodnieniem i utratą neuronów ruchowych w rdzeniu kręgowym, jądrach pnia mózgu i/lub w korze mózgowej. Ubytki komórek nerwowych są ostatecznie zastępowane przez komórki gleju. Uszkodzenie komórek piramidowych Betza i dróg korowo-rdzeniowych lub korowo-jądrowych określane jest mianem choroby górnego (ośrodkowego) neuronu ruchowego, natomiast patologia komórek ruchowych rogu przedniego rdzenia kręgowego, to choroba dolnego (obwodowego) neuronu ruchowego [1,2].

Sformułowanie „choroba neuronu ruchowego” używane jest często, jako synonim schorzenia uszkadzającego zarówno górny, jak i dolny neuron ruchowy – stwardnienia zanikowego bocznego (*ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS*). Tak naprawdę jednak do tej niejednorodnej rodziny zaliczamy również rdzeniowy zanik mięśni (*ang. spinal muscular atrophy, SMA*) i postępujący zanik mięśni (*ang. progressive muscular atrophy, PMA*), w których dochodzi do uszkodzenia wyłącznie dolnego neuronu ruchowego oraz pierwotne stwardnienie boczne (*ang. primary lateral sclerosis, PLS*) i postępujące porażenie opuszki (*ang. progressive bulbar palsy, PBP*) cechujące uszkodzenie wyłącznie neuronu górnego [1-3].

ALS, opisane po raz pierwszy w roku 1874 [4] pozostaje schorzeniem o niejednoznacznej etiologii i patogenezie [2,5,6], i związanym z tym brakiem możliwości skutecznej terapii i niekorzystnym rokowaniem. Swoją nazwę ALS zawdzięcza artykułowi opublikowanemu w 1984 roku przez Charcota [4], który opisuje w chorobie: „*ang. amiotrophic - zanik*” - atrofię zajętych mięśni; „*ang. sclerosis - stwardnienie*” - zwiększenie twardości tkanki podtrzymującej, otaczającej motoneurony

oraz „ang. *lateral* - boczne” - uszkodzenie włókien zstępujących w sznurze bocznym rdzenia kręgowego [7].

ALS ma postępujący przebieg. Nieuchronnie prowadzi do niepełnosprawności i śmierci pacjenta. Narastające osłabienie i zanik mięśni, także oddechowych, powodują zgon, zwykle w ciągu 2 - 5 lat od rozpoznania, z powodu niewydolności oddechowej lub powikłań unieruchomienia. Tylko ok. 10-20% chorych przeżywa ponad 10 lat [6,8].

Do substancji stosowanych w terapii ALS zaaprobowanych przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration, FDA*) należy jedynie pięć preparatów, z których jeden, zarejestrowany w roku ubiegłym, tofersen, jest pierwszą zatwierdzoną terapią ukierunkowaną na genetyczną przyczynę ALS [9]. Zatwierdzenie leku, w procedurze przyspieszonej ścieżki rejestracyjnej, dla chorych z ALS związanym z mutacją w genie dysmutazy ponadtlenkowej 1 (ang. *CuZn superoxide dismutase 1, SOD1*), odbyło się w oparciu o zmniejszanie stężenia łańcuchów lekkich neurofilamentów (markera neurodegeneracji) w osoczu pacjentów leczonych tofersenem. Kolejny lek, jedyny zarejestrowany w Polsce - riluzol, jest substancją ograniczającą ekscytotoksyczność poprzez zmniejszanie gromadzenia się glutaminianu w komórkach [10]. Riluzol wydłuża życie pacjentów o średnio 2-3 miesiące [6], nie wpływając na naturalny przebieg schorzenia. Trzeci, złożony preparat dekstrometorfanu i chinidyny jest stosowany objawowo przy afekcie rzekomoopuszkowym [11]. Dowiedziono, że podawany dożylnie edawaron ogranicza stres oksydacyjny u chorych z ALS, ale dokładny mechanizm jego działania nie jest do końca znany. Wykazano, że zwalnia postęp pogorszenia stanu neurologicznego oceniany Skorygowaną Funkcjonalną Skalą Stwardnienia Zanikowego Boczno (ang. *ALS Functional Rating Scale – Revised, ALSFRS-R*) [12] na wczesnym etapie choroby, tj. u pacjentów chorujących mniej niż dwa lata [10,12-14]. Ostatni, również złożony, preparat fenylomaślanu sodu (PB) i kwasu

tauroursodeoksycholowego (TUDCA) zarejestrowany przez FDA we wrześniu 2022r. wydłuża życie chorych – wg Paganoni et al. [15] o prawie 7 miesięcy w porównaniu do placebo, poprzez wpływ na siateczkę śródplazmatyczną i mitochondria [14].

Pomimo wielu prowadzonych badań, skuteczność dostępnych terapii jest niezadawalająca, czas przeżycia pacjentów z ALS pozostaje krótki, a jakość życia (*ang. quality of life, QoL*) chorych niesatysfakcjonująca. Zmusza to do dalszych poszukiwań skutecznej terapii ALS [16].

Brak możliwości leczenia przyczynowego związany jest przede wszystkim z nieznaną patofizjologią choroby. Sytuację pogarsza często opóźniona diagnoza [1,5,6]. Rozpoznanie schorzenia opiera się na kryteriach klinicznych i elektrofizjologicznych [17]. Nie istnieją markery biochemiczne, ani inne badania, które pozwoliłyby na wykrycie choroby w fazie przedwstępnej. Stąd też, kluczowe wydaje się odnalezienie czynników patofizjologicznych i patogenetycznych predysponujących do wystąpienia schorzenia, co w przyszłości mogłoby skutkować wczesnym jego wykryciem oraz skutecznym leczeniem przyczynowym prowadzącym do wydłużenia życia, a być może nawet wyleczenia.

„Biomarker” to termin opisujący obiektywnie mierzalny wskaźnik biologiczny, który świadczy o obecności procesu chorobowego, jego rozwoju oraz odpowiedzi na leczenie. Idealny biomarker ma wysoką czułość i swoistość, jest łatwy do pozyskania i analizy [18]. Dla chorób układu nerwowego najbardziej specyficzne wydają się markery płynu mózgowo-rdzeniowego [17,19], jednak ich uzyskanie przez nakłucie lędźwiowe jest procedurą inwazyjną, której wykonanie wymaga środowiska szpitalnego oraz specjalistycznej wiedzy i umiejętności, a także wyszkolonego personelu laboratoryjnego. Łatwiejsze do pozyskania i zbadania są markery krwi obwodowej. Udowodniono, że ich

stężenie wykazuje statystycznie istotną korelację ze stężeniem tych samych substancji w płynie mózgowo-rdzeniowym [17].

W badaniach neuropatologicznych tkanki mózgowej chorych na ALS procesowi neurodegeneracyjnemu towarzyszy zawsze zapalenie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w postaci aktywacji mikrogleju oraz nacieku limfocytów T i makrofagów. Do niedawna przyjmowało się, że jest ono wtórne do samego zwyrodnienia, jednak badania genu *SOD1* na myszach wykazały, że cechy zapalenia (m. in. pod postacią aktywacji mikrogleju i składowych układu dopełniacza) były obecne jeszcze przed rozpoczęciem się degeneracji [20,21]. Ostatnie lata zmieniają myślenie o ALS w kontekście choroby pierwotnie neurozwyrodnieniowej. Pojawiają się postulaty, iż początek procesu chorobowego może mieć miejsce poza OUN i być związany ze stanem zapalnym i aktywacją nieswoistego układu odpornościowego, w szczególności z układem dopełniacza [5,21].

Zarysowuje się zatem pytanie, czy można powiązać jakiś mierzalny parametr laboratoryjny opisujący układ odpornościowy organizmu z przebiegiem schorzenia, a może nawet przede jego klinicznym ujawnieniem się? Obiecującymi biomarkerami w ALS wydają się markery zapalne krwi obwodowej, pośrednio ukazujące stan całości układu odpornościowego [6,22] oraz czynniki neurotroficzne, w szczególności neurotrofiny [23-26].

Pierwsze badania naukowe w tym zakresie zostały opublikowane w latach 2004-2008. Ciągle jeszcze są to pojedyncze prace, których wyniki pozostają niespójne. To, co budzi optymizm, to wielokrotnie potwierdzone podwyższone stężenia cytokin prozapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z ALS [6,17,24,27]. Dowodzą one również związku stężenia markerów zapalnych krwi obwodowej z dynamiką schorzenia

[19,28]. Badania z wykorzystaniem neurotrofin *in vitro* i *in vivo* na modelu zwierzęcym oraz ludzkim, przyniosły niestety niejednoznaczne wyniki [23,25].

1.1 STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

1.1.1 Epidemiologia

ALS jest schorzeniem występującym na całym świecie z podobną częstotliwością, poza kilkoma obszarami o zwiększonej zachorowalności; np. na wyspie Guam odnotowano większą częstość występowania zespołu ALS z parkinsonizmem i otępieniem; w populacji norweskiej większą częstość występowania mutacji powodujących ALS [1]. Zapadalność jest szacowana na 1-3 przypadki na 100 tys., natomiast chorobowość na 5-8 osób na 100 tys., co czyni ALS najczęstszą wśród osób dorosłych chorobą neuronu ruchowego. Mężczyźni chorują 1,5 - 3 razy częściej niż kobiety. [1,2,5,6,23,29]. Szczyt zachorowań przypada na 50-70. rż. [2,8,30], a tylko u ok. 10% osób ALS pojawia się przed 40 rż. Opisywano również pacjentów, u których schorzenie ujawniło się przed 30., a nawet 20. rż - są to zwykle przypadki o charakterze dziedzicznym [1,2]. Ryzyko choroby wzrasta do 8. dekady życia, a następnie maleje [1,2].

Z etnicznego punktu widzenia, wydaje się, że choroba występuje częściej w populacji kaukaskiej [30,31]. Ponadto istnieją sugestie o zwiększonej chorobowości wśród niektórych grup sportowców, szczególnie w sportach narażonych na powtarzalne urazy głowy [1].

Średnia przeżywalność od momentu pojawienia się pierwszych objawów do śmierci wynosi pomiędzy 2, a 5 lat [8,23,30,32], ale ok. 35% pacjentów przeżyje ponad 5 lat [30], a 10-20% nawet ponad 10 lat [8]. Zgon spowodowany jest zwykle niewydolnością oddechową [2,32].

Zdecydowana większość, bo 90-95% przypadków ALS to przypadki sporadyczne (*ang. sporadic ALS, sALS*), o nieznanym przyczynie lub spowodowane mutacjami *de novo*. Pozostałe 5-10 % przypadków występuje rodzinie (*ang. familial ALS, fALS*) i jest związanych z mutacjami znanych genów. Nie ma istotnych różnic w przebiegu klinicznym postaci sporadycznej i rodzinnej, poza wcześniejszym wiekiem zachorowania (zwykle 10 lat wcześniej w fALS). [1,5]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 50 różnorodnych mutacji odpowiadających/przyczyniających się do rozwoju fALS, ale co roku liczba ta wzrasta. Większość przypadków fALS jest dziedziczona autosomalnie dominująco, ale istnieją mutacje dziedziczone autosomalnie recesywnie oraz związane z chromosomem X. Najczęstszą opisywaną mutacją, odpowiadającą za nawet 40% przypadków fALS, jest mutacja w genie *C9orf72*, która powoduje występowanie zarówno ALS, jak i otępienia czołowo-skroniowego (*ang. frontotemporal dementia, FTD*) [33]. Drugie w kolejności są mutacje w genie *SOD1* kodującym dysmutazę ponadtlenkową, które stanowią ok. 15-20% przypadków fALS [1,5,25,34].

1.1.2 Obraz kliniczny choroby

1.1.2.1 KRYTERIA ROZPOZNANIA

Pierwsze, wstępne kryteria rozpoznania ALS, oparte na znaleziskach elektrodiagnostycznych pojawiły się już w latach 50 XX wieku. Jednak dopiero w roku 1994r. po konferencji w hiszpańskim El Escorial Światowa Federacja Neurologii (*ang. World Federation of Neurology, WFN*) opublikowała jednorodny system kryteriów, służący przede wszystkim do celów badań naukowych. Kryteria te zostały zmodyfikowane w roku 2000 i w tej formie, jako tzw. kryteria „Airlie House” są najczęściej wykorzystywane [1,35,36]. Stawiając rozpoznanie ALS, w pierwszej kolejności wykluczamy elektrofizjologiczne, patologiczne i neuroobrazowe cechy

wskazujące na inne procesy chorobowe, a następnie oceniamy pacjenta klinicznie biorąc pod uwagę cztery potencjalnie uszkodzone regiony OUN (pień mózgu (opuszka), rdzeń szyjny, rdzeń piersiowy, rdzeń lędźwiowo-krzyżowy) oraz to, czy uszkodzony jest zarówno górny, jak i dolny motoneuron. Na tej podstawie możemy postawić rozpoznanie:

- klinicznie pewnego ALS: gdy objawy uszkodzenia górnego (*GNR*) i dolnego neuronu ruchowego (*DNR*) występują w regionie opuszki oraz min. 2 regionach rdzeniowych LUB gdy objawy uszkodzenia *GNR* występują w min. 2 regionach rdzeniowych a objawy uszkodzenia *DNR* w min. 3 regionach rdzeniowych
- klinicznie prawdopodobnego ALS: gdy objawy uszkodzenia *GNR* i *DNR* występują w co najmniej 2 regionach, z czego niektóre objawy uszkodzenia *GNR* występują bardziej dogłównie w stosunku do objawów uszkodzenia *DNR*
- klinicznie prawdopodobnego ALS potwierdzonego wynikami badań laboratoryjnych: gdy kliniczne objawy uszkodzenia *GNR* i *DNR* występują w 1 regionie LUB gdy wyłączone objawy uszkodzenia *GNR* występują w 1 regionie a objawy uszkodzenia *DNR* widoczne są w badaniu EMG z co najmniej 2 regionów
- klinicznie możliwego ALS: gdy objawy uszkodzenia *GNR* i *DNR* występują w 1 regionie LUB gdy wyłączone objawy uszkodzenia *GNR* występują w co najmniej dwóch regionach LUB gdy objawy uszkodzenia *DNR* występują dogłównie w stosunku do objawów uszkodzenia *GNR*. [35,36].

Celem zwiększenia czułości kryteriów, a co za tym idzie wcześniejszego i wiarygodniejszego rozpoznania choroby, w roku 2008 Międzynarodowa Federacja Neurofizjologii Klinicznej (*ang. International Federation of Clinical Neurophysiology*,

IFCN) opracowała tzw. kryteria Awaji-Shima. W celu postawienia diagnozy, konieczne jest poprzez wykonanie badań dodatkowych (elektrofizjologicznych, neuroobrazowych, neuropatologicznych) wykluczenie innych procesów patologicznych oraz potwierdzenie obecności objawów charakterystycznych dla ALS tj. 1) zwyrodnienia GNR w badaniu klinicznym, 2) zwyrodnienia DNR w badaniu klinicznym, elektrofizjologicznym lub neuropatologicznym oraz 3) postępującego szerzenia się objawów stwierdzanych w badaniu klinicznym lub elektrofizjologicznym. Na tej podstawie rozpoznajemy:

- kliniczne pewne ALS: kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR w regionie opuszkowym i min. 2 regionach rdzeniowych LUB objawy uszkodzenia GNR i DNR w min. 3 regionach rdzeniowych
- klinicznie prawdopodobne ALS: kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR w min. 2 regionach, z czego niektóre objawy uszkodzenia GNR występują bardziej dogłównie w stosunku do objawów uszkodzenia DNR
- klinicznie możliwe ALS: kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR występują w 1 regionie LUB wyłączone objawy uszkodzenia GNR występują w co najmniej dwóch regionach LUB objawy uszkodzenia DNR występują dogłównie w stosunku do objawów uszkodzenia GNR. [1,36].

Kryteria Airline House i Awaji-Shima porównywano kilkakrotnie, stwierdzając wyższą czułość tych drugich, zwłaszcza w przypadkach o początku opuszkowym [36-39]. Nadal jednak u wielu pacjentów, szczególnie z objawami pozaruchowymi, rozpoznanie jest znacznie opóźnione [36,40]. W związku z różnorodnością fenotypu ALS, sugerowane jest uwzględnianie czynników genetycznych, a także subfenotypów choroby, a przede wszystkim indywidualne podejście do każdego pacjenta [5,40,41]. Korzystanie

ze skomplikowanych kryteriów rozpoznania, które często spełniane są dopiero w późnym stadium ALS nie jest łatwe i praktyczne z punktu widzenia lekarzy, ani komfortowe dla pacjentów, aktualnie nie ma jednak żadnego innego, jednoznacznego testu potwierdzenia choroby [5,36,40,41]. Porównanie używanych kryteriów diagnostycznych ALS przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. **Kryteria rozpoznania ALS.**

	Kliniczne pewne ALS	Kliniczne prawdopodobne ALS	Kliniczne prawdopodobne ALS potwierdzone wynikami badań laboratoryjnych	Możliwe ALS	Podejrzenie ALS
Kryteria EL Escorial (1994r.)	objawy uszkodzenia GNR i DNR w 3 regionach	objawy uszkodzenia GNR i DNR w min. 2 regionach, z czego niektóre objawy uszkodzenia GNR występują dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia DNR	-	objawy uszkodzenia GNR i DNR w 1 regionie LUB wyłączne objawy uszkodzenia GNR w min. 2 reg. LUB objawy uszkodzenia DNR dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia GNR	wyłączne objawy uszkodzenia DNR
Kryteria Airlie House (2000r.)	objawy uszkodzenia GNR i DNR w regionie opuszkowym oraz min. 2 reg. rdzeniowych LUB objawy uszkodzenia GNR w min. 2 reg. rdzeniowych a objawy uszkodzenia DNR w min. 3 reg. rdzeniowych	objawy uszkodzenia GNR i DNR w min. 2 regionach, z czego niektóre objawy uszkodzenia GNR występują dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia DNR	kliniczne objawy uszkodzenia GNR i DNR w 1 regionie LUB wyłączne objawy uszkodzenia GNR w 1 reg. a objawy uszkodzenia DNR w badaniu EMG z co najmniej 2 reg.	objawy uszkodzenia GNR i DNR w 1 regionie LUB wyłączne objawy uszkodzenia GNR w min. 2 reg. LUB objawy uszkodzenia DNR dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia GNR	-
Kryteria Awaji-Shima (2008r.)	kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR w regionie opuszkowym i min. 2 reg. rdzeniowych LUB objawy uszkodzenia GNR i DNR w min. 3 reg. rdzeniowych	kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR w min. 2 regionach, z czego niektóre objawy uszkodzenia GNR występują dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia DNR	-	kliniczne lub elektrofizjologiczne dowody uszkodzenia GNR i DNR w 1 regionie LUB wyłączne objawy uszkodzenia GNR w min. 2 reg. LUB objawy uszkodzenia DNR dogłowo w stosunku do objawów uszkodzenia GNR	-

Za: Al-Chalabi A., Hardiman O., Kiernan M.C., Chiò A., Rix-Brooks B., van den Berg L.H. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol.* 2016;15(11):1182-94. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30199-5 [36]

Z uwagi na toczące się liczne badania kliniczne w ALS, w 2020r. zaproponowano nowe, prostsze kryteria, dzięki którym więcej pacjentów będzie mogło skorzystać z ewentualnych możliwości leczenia. Tzw. kryteria Gold Coast obejmują: postępujący niedowład poprzedzony prawidłową funkcją ruchową, cechy uszkodzenia GNR oraz DNR na co najmniej 1 poziomie lub cechy uszkodzenia DNR na co najmniej 2 poziomach, a także wykluczenie innych przyczyn [42].

1.1.2.2 OBJAWY

ALS może powodować uszkodzenie każdego mięśnia, stąd pierwsze objawy bywają różnorodne - mogą dotyczyć grup mięśni i/lub pojedynczego mięśnia kończyn górnych, dolnych (np. opadanie stopy), ale też mięśni opuszkowych, manifestując się z dyzartrią i dysfagią [1,41]. Co ciekawe, względnie rzadko uszkodzone są mięśnie okoruchowe oraz zwieracze [2,41], często natomiast w pierwszej kolejności pojawia się asymetryczne zajęcie kończyn górnych [1,2]. Osłabienie zwykle pojawia się wcześniej w mięśniach dystalnych (z początku jeden poziom uszkodzenia). Uwzględniając pierwsze objawy, chorobę można podzielić na postać o początku kończynowym (klasyczna; 65-70% chorych), opuszkowym (30%) oraz oddechowym (do 5%) [5,30].

W miarę postępu choroby, w ciągu kilku tygodni lub miesięcy, dochodzi do progresji deficytów, zarówno lokalnej (w tym samym rejonie), a także do rejonów odpowiadających anatomicznie (np. kontrlateralnie), jak i, w ciągu kilku lat, do innych poziomów OUN. Dynamika choroby i czas jej trwania są indywidualne [2]. Najbardziej niekorzystny przebieg wydaje się mieć ALS o początku opuszkowym, w którym czas przeżycia wynosi 2-3 lata [5]. Brak bólu i zaburzeń czucia przy postępującym upośledzeniu sprawności jest jedną z cech charakterystycznych [1].

W badaniu neurologicznym u chorych z ALS stwierdza się cechy uszkodzenia GNR i DNR. Początkowe zajęcie tylko jednego z nich sukcesywnie zmienia się w zajęcie obu [41]. Do klinicznych objawów uszkodzenia GNR zaliczamy: niedowłady, wzmożone napięcie mięśniowe typu spastycznego, hiperrefleksję, objawy patologiczne (w pierwszej kolejności objaw Babińskiego) oraz afekt rzekomoopuszkowy. Objawami uszkodzenia DNR są: zaniki mięśniowe, skurcze mięśni oraz fascykulacje, zwłaszcza tułowia i języka [1,2,30]. Zwykle w kończynach dolnych dominują objawy uszkodzenia GNR, a w górnych DNR [2]. Początkowo wygórowane odruchy następnie normalizują się, by w końcu zaniknąć [2].

Do innych istotnych, wtórnych objawów ALS należą zaburzenia chodu oraz utrata masy ciała i wyniszczenie (związane z zanikami i dysfagią). Najczęstszymi przyczynami zgonu są niewydolność oddechowa spowodowana osłabieniem mięśni oddechowych przepony i międzyżebrowych), często powikłana wynikającym z dysfagii zachłystowym zapaleniem płuc oraz inne powikłania zapalne [1,5,41]. W ostatnim etapie życia pacjent traci zdolność ruchu kończyn, połykania, komunikacji, a nawet samodzielnego oddechu [5].

Szacuje się, że nawet połowa pacjentów z ALS ma zaburzenia funkcji poznawczych [2,43], a 5-15% z nich, częściej w postaciach rodzinnych, spełnia kryteria rozpoznania otępienia [1,2,43]. Szczególną rolę odgrywa tu FTD. Nasilenie otępienia koreluje w tym przypadku z nasileniem objawów uszkodzenia motoneuronu [1,41]. Nieprawidłowości mogą dotyczyć emocji, nastroju, pamięci, planowania, uwagi, funkcji wykonawczych, fluencji słownej, organizacji czy funkcji wzrokowo-przestrzennych. Ponieważ większość kwestionariuszy oceniających funkcje poznawcze wymaga od chorego zdolności mówienia i pisania, ocena obecności i nasilenia otępienia jest trudna, a czasami wręcz niemożliwa [41].

U około 10% pacjentów z ALS rozpoznaje się także depresję [2], a w badaniach populacyjnych udowodniono częstsze występowanie schizofrenii wśród krewnych chorych [44,45]. ALS może być również związane z innymi chorobami neurozwyrodnieniowymi, takimi jak pierwotnie postępująca afazja i choroba Parkinsona [2].

1.1.2.3 WARIANTY

W kategoryzacji chorób neuronu ruchowego spotykamy dwa podejścia – mówimy o odmianach chorób neuronu ruchowego [1] lub o klinicznych wariantach ALS [2,41]. W obu przypadkach wyróżniamy te same jednostki chorobowe, które od ALS różnią się przede wszystkim lokalizacją objawów, zajęciem GNR lub DNR i przebiegiem, są też dużo rzadsze [46,47]. Trwa debata, czy schorzenia te uznać za odmiany ALS, czy za odrębne jednostki chorobowe [41,47]. Wyróżniamy tu:

- PMA, klinicznie uszkadzający jedynie DNR; obraz kliniczny i przebieg choroby są podobne do ALS, przeżycie zwykle o kilka lat dłuższe [47]; badania autopsyjne chorych z PMA wykazują zajęcie również dróg korowo-rdzeniowych, występowanie mutacji typowych dla ALS i objawy zaburzeń funkcji poznawczych [2,41];
- PLS, klinicznie uszkadzające jedynie GNR; dominują objawy opuszkowe; choroba raczej z wykluczenia; jej rozpoznanie wymaga minimum czteroletniej obserwacji [1,41]; przebieg jest zwykle znacznie dłuższy niż ALS, rzadko zajęte są mięśnie oddechowe [2,41,46];
- PBP, klinicznie zajmujące jedynie mięśnie opuszkowe; występuje bardzo rzadko, aktualnie raczej przyjmuje się, że jest to ALS o początku opuszkowym [1,2,47];

- Inne rzadkie jednostki, takie jak: jednokończynowy zanik mięśni (choroba Hirayamy), dwuramienny zanik mięśni (zespół człowieka w beczce), neuropatia czuciowa i ruchowa twarzy oraz zespoły ALS-parkinsonizm i ALS-FTD [1,2,46,47].

Różnicowanie między ww. chorobami ma znaczenie przede wszystkim dla rokowania [1,41].

1.1.3 Patogeneza

W patogenezie ALS biorą udział czynniki genetyczne, środowiskowe (także toksyczne) oraz związane ze stylem życia [1,2,30], mające wydaje się wpływy na metabolizm i homeostazę (proteostazę) białek. W 2014r. opublikowano wyniki badania, przeprowadzonego w pięciu krajach, na ponad 30-milionowej populacji, w którym na podstawie zależności matematycznej stwierdzono, że zachorowanie na ALS jest rezultatem wielostopniowego procesu składającego się z sześciu koniecznych czynników genetycznych lub środowiskowych. Niestety nie określono, jakie to miałyby być czynniki [48,49].

1.1.3.1 PATOGENEZA – GENY GŁÓWNE

W 1993r., wraz z odkryciem mutacji genu *SOD1*, rozpoczęła się nowa era w badaniach nad patogenezą ALS [2,30]. Dziś wiemy, że 5 do 10% przypadków ALS stanowią postacie występujące rodzinnie spowodowane mutacjami różnorodnych genów. Dziedziczenie zwykle jest autosomalnie dominujące [1,2,30]. W badaniach nad bliźniętami stwierdzono wyższe ryzyko choroby dla bliźniąt monozygotycznych niż dzygotycznych oraz wyższe ryzyko dla bliźniąt w porównaniu do populacji ogólnej

[30,50]. Opisywano również zwiększone ryzyko zachorowania u bliskich krewnych, nawet mieszkających w różnych miejscach [51].

1.1.3.1.1 Gen *C9ORF72* (9p21)

Najczęstszą przyczyną fALS i sALS jest mutacja genu *C9orf72* [26], zwłaszcza częsta w populacji kaukaskiej [52,53]. Powoduje ALS, FTD, bądź zespół kliniczny przebiegający z połączenia tych dwóch fenotypów (FTD-ALS). Została również zidentyfikowana w przebiegu AD (*ang. Alzheimer disease, AD*), Parkinsona (*ang. Parkinsons disease, PD*), czy otępienia z ciałami Levy'ego [52-54]. W przypadku ALS mutacja wiąże się z częstszym występowaniem postaci opuszkowej oraz krótszym przeżyciem. Wydaje się, że na fenotyp wpływają dodatkowe czynniki modulujące; w badanych grupach był on bardzo różnorodny, nawet w obrębie jednej rodziny [52-54]. Penetracja mutacji zwiększa się z wiekiem, ale nigdy nie osiąga 100% [55].

Mutacja genu *C9orf72* skutkuje nadmierną liczbą powtórzeń heksanukleotydów (GGGGCC) [22,37]. Nie jest do końca jasne ile powtórzeń jest patogennych (przyjmuje się 20-30), ani czy ilość powtórzeń koreluje z ciężkością objawów klinicznych. Rola białka kodowanego przez gen *C9orf72* pozostaje nieznana, jednak od czasu jego odkrycia w 2011r. pojawiło się kilka sugestii co do patogenez. Wiemy, że transkrypty RNA zmutowanego genu formują w jądrze komórki toksyczne ogniska [56], a także, że ulegają one niekonwencjonalnej metodzie translacji, co powoduje tworzenie się w komórce neurotoksycznych dipeptydów (*ang. dipeptide repeat proteins, DPR*) [57]. DPR gromadzą się głównie w mózgowiu, zwłaszcza w płatach czołowych, i w mniejszym stopniu w rdzeniu kręgowym, co tłumaczyłoby częsty początek opuszkowy w tym typie choroby [30].

Zwracano uwagę, że białko może brać udział w transporcie endosomalnym i regulować mechanizmy autofagii. Jego mutacja zwiększa więc wrażliwość komórki na czynniki egzotoksyczne [57-59]. O'Rourke et al. [60] wykazali, że u myszy pozbawionych genu *C9orf72* pojawiały się postępująca splenomegalia i limfadenopatia z akumulacją nabrzmiątych komórek przypominających makrofagi, a także zmieniała się odpowiedź immunologiczna w mikrogleju, czego następstwem była odpowiedź zapalna neuronów podobna do obserwowanej u pacjentów z ALS. U myszy nie stwierdzano jednak objawów choroby układu nerwowego [60], co mogłoby sugerować konieczność zaistnienia dodatkowo czynnika wywołującego. W kolejnej publikacji na tak samo zmodyfikowanej linii myszy Atanasio et al. [61] zwrócili uwagę na ekspansję tkanki mieloidalnej, aktywację limfocytów T i zwiększoną ilość komórek plazmatycznych oraz autoprzeciwiań. U pacjentów z mutacją genu *C9orf72* podnoszono również występowanie akumulacji nieprawidłowego białka TDP-43 w neuronach mózdzku oraz w skórze [62]. Ponadto, co wydaje się szczególnie ważne w kontekście tej pracy, motoneurony u takich chorych wykazują upośledzoną endocytozę receptorów TrkB charakterystycznie wiążących BDNF, co wpływa negatywnie na szlaki sygnałowe regulujące przeżycie tych komórek [58,63].

Podsumowując, mechanizm patogenezy ALS spowodowanego mutacją *C9orf72* jest skorelowany z neurotoksycznością związaną z RNA, zaburzoną funkcją mikrogleju oraz nadmiernym, patologicznym pobudzeniem układu immunologicznego. Nie wiemy jednak, jaki czynnik jest odpowiedzialny za pojawienie się objawów klinicznych.

1.1.3.1.2 Gen *SOD1* (21q22.1)

Gen *SOD1* koduje białko cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej typu I zawierającej cynk i miedź, która w warunkach fizjologicznych odpowiada za rozpad

anionorodnika ponadtlenkowego zapobiegając stresowi oksydacyjnemu [64]. Mutacje *SOD1*, to druga, co do częstości, znana przyczyna ALS [2,25]. Inaczej niż w przypadku genu *C9orf72*, nie jedna, ale wiele różnych mutacji *SOD1* powoduje wystąpienie choroby. Do chwili obecnej znaleziono ich ponad 180, z czego niektóre charakteryzują znacznie cięższy przebieg kliniczny [25,34,64]. Samo stwierdzenie wystąpienia mutacji nie dowodzi jednak, że pacjent zachoruje na ALS, np. w populacji skandynawskiej aż 2-3% społeczeństwa jest bezobjawowym nosicielem mutacji typu *D90A* [2].

Po odkryciu mutacji genu *SOD1* w latach 90. sądzono, że mechanizm patogenetyczny choroby będzie miał związek z ubytkiem funkcji białka („loss of function”) i co za tym idzie, nasileniem stresu oksydacyjnego. Prawda jednak okazała się bardziej złożona [34]. Zmutowany gen powoduje destabilizację dimerycznej struktury białka i powstanie jego nieprawidłowej wersji, która następnie ulega nieprawidłowemu fałdowaniu i agregacji. Takie konglomeraty białkowe gromadzą się w neuronach powodując ich degenerację [30,64,65]. Jest to uznawane za główny patomechanizm ALS powodowanej mutacją genu *SOD1* („toxic gain of function”). W badaniu Reaume et al. [66] z roku 1996 wykazano, że myszy bez genu *SOD1* rozwijają się normalnie, choć mają zwiększoną wrażliwość na uszkodzenie aksonów. W trakcie kolejnych badań na myszach *SOD1* (-) okazało się, że po dłuższym czasie również pojawia się u nich denerwacja mięśni [67], nigdy jednak nie obserwowano fenotypu typowego dla ALS [34].

W badaniu z użyciem linii komórkowej z implantowanym, nienatywnym białkiem *SOD1* stwierdzono, że jest ono toksyczne dla poprzednio zdrowych neuronów, co ewidentnie sugeruje cytotoksyczność nieprawidłowo sfałdowanych agregatów niezależnie od innych czynników [65]. W związku z tym zaburzona jest przede wszystkim homeostaza białkowa, tj.: transport do i z komórki, budowa cytoszkieletu i funkcja mitochondriów oraz mechanizmy degradacji, co powoduje stres komórkowy oraz

następową retrakcję aksonów i śmierć komórki [68]. Ponadto, agregaty mają cechy właściwe dla białek prionowych, tzn. mają możliwość przenikania do zdrowych neuronów znajdujących się w pobliżu i następnie zmiany konformacji prawidłowego *SOD1* [68-70]. Proces jest samonapędzający się i postępujący, co tłumaczyłoby postępujący przebieg samego ALS [69] oraz szerzenie się choroby na sąsiadujące rejony anatomiczne [68]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że agregaty nieprawidłowego białka indukują pobudzenie otaczających komórek mikrogleju, astrogleju oraz makrofagów, co powoduje wyrzut prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin, takich jak TNF- α , IL-1 β , IL-4 czy IL-6 [71,72]. Sugerowano także nadmierną akumulację jonów miedzi oraz nieprawidłowe wiązanie jonów metali w reakcjach katalizowanych przez enzymy jako jeden z czynników powodujących chorobę [34].

Co ciekawe, u chorych na ALS bez mutacji genu *SOD1*, również znajdowano nieprawidłowe białko *SOD1* w motoneuronach. Sugerowano, że jest to wynik tendencji do błędnego fałdowania pod wpływem stresu oksydacyjnego spowodowanego inną przyczyną lub, że *SOD1* może być po prostu częścią bardziej złożonego procesu patomechanicznego [73,74].

Podsumowując, mechanizmy patogenezы ALS powodowanego mutacją genu *SOD1* są związane z neurotoksycznością spowodowaną nieprawidłową agregacją białek i wtórnymi do tego faktu zaburzeniami, takimi jak dysfunkcja mitochondriów i gleju, transport komórkowy i autofagia, ale też stresem oksydacyjnym oraz pobudzeniem układu immunologicznego.

1.1.3.1.3 Gen *TARDBP* – białko TDP-43 (1p36.22)

Gen *TARDBP* koduje białko o masie 43kDa wiążące obszary odpowiedzi transkryptywnej (TAR) DNA, którego rolą jest uczestniczenie w procesach transkrypcji,

składania, obróbki oraz transportu RNA [1,75]. Białko wchodzi w interakcje z innymi regulatorami transkrypcji, a także hamuje splicing eksonów krytycznych, co skutkuje utrzymaniem integralności RNA [75,76]. Jest to ważne szczególnie w przypadku neuronów, które w porównaniu do innych komórek zawierają długie sekwencje intronów [68]. Białko w stanie fizjologicznym znajduje się w większości w jądrze komórki, przy mutacji natomiast jądro zostaje oczyszczone, a w cytoplazmie gromadzą się nierozpuszczalne, ubikwitynowane agregaty TDP-43 [76]. To samo dzieje się, gdy komórka zostaje poddana stresowi, np. oksydacyjnemu. Do cytoplazmy z jądra wydostają się tzw. granulki stresu, do czego konieczna jest obecna w białku domena podobna do tej właściwej dla białek prionowych („prion-like”) [68]. Stąd też w patogenezie musimy brać pod uwagę zarówno utratę funkcji proteiny związanej z przetwarzaniem DNA, jak i toksyczność agregatów gromadzących się w komórce [68].

Mutacje *TARDBP* są związane z występowaniem ALS i FTD [1,2]. Co ciekawe, inkluzje TDP-43 pojawiają się częściej niż sama mutacja genu. Są obecne u nawet 97% chorych z ALS i około 50% chorych z FTD, także w powiązaniu z innymi mutacjami, m.in. *C9orf72* [43,77,78]. Z tego powodu choroby te zaliczamy do TDP-43-proteinopatii. Sugeruje się, że białko ma centralną rolę w patogenezie ALS, gdzie komórka z różnych przyczyn gromadzi jego nieprawidłową formę [76].

1.1.3.1.4 Gen *FUS* (ang. *fused in sarcoma*; 16p11.2)

Białko FUS należy do rodziny białek FET [68]. Funkcje w komórce i mechanizmy cytotoxyczości są tu podobne jak w przypadku białka TDP-43. FUS jest więc wykorzystywane w metabolizmie RNA, w tym w szczególności w splicingu [79]. Posiada domenę właściwą dla białek prionowych istotną dla jego agregacji. Występuje

głównie w jądrze komórkowym, a w cytoplazmie znajdziemy je w okolicach postsynaptycznych [68].

W przypadku większości mutacji białko zmniejsza swoje stężenie w jądrze, a gromadzi się w cytoplazmie przez wytworzenie tzw. granulek stresu tworząc specyficzne wtręty [80,81]. Tu również mamy więc do czynienia z nakładaniem się na siebie mechanizmów utraty funkcji i toksycznego nabycia funkcji. Ponadto stwierdzono, że w komórkach z akumulacją FUS występują zmniejszone stężenia ATP [82].

W rodzinnej formie ALS mutacje *FUS* są częste. W grupie chorych poniżej 40 rż. odpowiadają za około 35% zachorowań [30]. Niektóre są bardziej agresywne klinicznie niż inne, zwłaszcza w postaciach z inkluzjami zawierającymi bazofile w motoneuronach [83].

Łącznie, cztery wymienione wyżej mutacje genów są odpowiedzialne za około 60-80% przypadków fALS [53].

1.1.3.2 GENY I ICH DZIAŁANIE NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

W badaniach dotyczących ALS przeprowadzonych w ostatnich latach, wielokrotnie sugerowano wpływ mutacji różnych genów na patogenezę choroby. Niektóre z nich możemy identyfikować jednoznacznie jako przyczynowe, m.in. te wymienione wyżej; niektóre można traktować jedynie jako zwiększające ryzyko zachorowania. Trzeba pamiętać, że białka same w sobie mogą pełnić pewną funkcję, a w połączeniu z innymi, w kompleksach, całkiem inną, co sprawia, że proces poszukiwania patogenezy choroby jest jeszcze bardziej skomplikowany. Być może przy mutacji danego genu patogenetyczna staje się właśnie utrata roli jego produktu w innym niż podstawowy szlak metaboliczny [68]. Ponadto w przypadku nieprawidłowych

białek musimy brać pod uwagę zarówno „loss of function”, jak i toksyczne „gain of function”.

Mutacje te działają na komórkę w różnych mechanizmach, z czego wiele upośledza funkcje komórki w podobny sposób [30], przez wpływ na:

A. Metabolizm RNA.

Poza mutacjami *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* oraz *FUS* wiele rzadziej spotykanych genów może wpływać na rozwój ALS i innych chorób neurodegeneracyjnych poprzez wpływ na RNA, m.in. *TAF15* czy *EWSR* (kodujące białka z rodziny FET, również zawierające domeny właściwe dla białek prionowych) [84]. RNA, będąc niejako pierwotną częścią procesu produkcyjnego białek, może zostać uszkodzone na etapie transportu, edycji potranskrypcyjnej, translacji i degradacji. Rolę w tych procesach, odgrywają tzw. regulatorowe białka wiążące RNA (RBP), z których kluczowym jest wspomniane wcześniej jądrowe białko TDP-43, dla którego miejsce wiązania ma nawet około 30% transkryptomu [85,86]. Ponadto, niskie stężenie RNA powoduje antagonistyczne zwiększenie ilości TDP-43, które w ALS przechodzi z jądra do cytoplazmy, gdzie ma tendencję do agregacji [87].

B. Szeroko rozumianą homeostazę białkową.

Geny zaangażowane m.in. w transport komórkowy, degradację proteasomalną i autofagię; z wyżej wymienionych *TARDBP*, *C9orf72* oraz *SOD1*, ponadto: *CCNF* (szlak ubikwitynowy), *UBQLN2* (szlak ubikwitynowy i autofagii; dostarczające białka do degradacji do proteasomów, również znajdujące się w specyficznych wtrętach), *SQSTM1* (podobna rola), *VCP* (autofagia, degradacja w proteasomach oraz reakcje w siateczce endoplazmatycznej), rzadziej *CHMP2B* (autofagia), *OPTN* (optyneuryna - transport

komórkowy, transkrypcja i odpowiedź immunologiczna), *FIG4* (funkcja lizosomów). [30,68,88].

Jak wspomniano wyżej, istotnymi dla ALS znaleziskami histopatologicznymi są cytoplazmatyczne, eozynochłonne wtręty zwane ciałkami Buniny, struktury podobne do ciał Lewy'ego oraz agregaty ubikwitynowanego białka TDP-43 należącego do grupy RBP [89,90] – te ostatnie są znajdywane nawet u 97% chorych [91]. Białko to, fizjologicznie znajdujące się w jądrze komórkowym, w ALS przechodzi do cytoplazmy, gdzie przejawia skłonność do tworzenia neurotoksycznych, nieprawidłowo sfałdowanych agregatów [87,89]. Nie wiadomo, czy agregaty same w sobie są przyczyną czy skutkiem degeneracji neuronu, natomiast z pewnością stwierdzono, że zmniejszenie ich ilości w komórce działa neuroprotekcynie [89,92,93]. Komórki nerwowe chorych z ALS nie radzą sobie z usuwaniem nieprawidłowych form białka, co może być kluczowe dla patogenezy schorzenia. Neurony są w większości komórkami niedzielącymi się, nie są więc w stanie rozcieńczać agregatów poprzez podział komórki. Błędnie sfałdowane białka nie są również skutecznie usuwane przez szlaki degradacji białek - system proteasomów ubikwityny oraz autofagię [87]. Co ciekawe, w inkluzjach TDP-43 wykrywana jest ubikwityna, co sugerowałoby, że zostały one rozpoznane przez organizm jako nieprawidłowe, ale doszło do dysfunkcji w zakresie któregoś z etapu/etapów degradacji białek [94]. W badaniu przeprowadzonym w warunkach *in vitro* z 2014r. [95] zahamowanie szlaku ubikwitynowego (ale nie szlaku autofagii) spowodowało powstawanie nierozpuszczalnych agregatów, natomiast przy ich degradacji okazało się, że rozpuszczalny TDP-43 jest rozkładany głównie przez ubikwitynę, podczas gdy usuwanie zagregowanego TDP-43 wymaga uczestnictwa autofagii. Stwierdzono więc, że makroagregaty mogą być stopniowo degradowane tylko wtedy, gdy oba szlaki są czynne.

Nieprawidłowości w zakresie przechodzenia białek w najlepszą dla danego środowiska formę (np. płynu czy żelu), interakcji między nimi lub wcześniejszego fałdowania również mogą powodować przejście z fazy rozpuszczalnej w nierozpuszczalną i agregację protein w komórce, ale także wadliwe ich działanie, gdy nie przyjęły odpowiedniej dla swojej funkcji formy [87,94,96].

Poza TDP-43 w neuronach chorych mogą gromadzić się również m.in. agregaty SOD-1 i FUS. Należy też pamiętać, że agregaty mogą być przekazywane do innych komórek w pobliżu (hipoteza prionowa – jak wyżej) [68-70,87].

C. Ekscytotoksyczność związaną z glutaminianem.

Neurony mogą mieć różną podatność na radzenie sobie ze stresem, różny potencjał regeneracyjny oraz różną wrażliwość na glutaminian. W przypadku mutacji *SLC1A2* kodującego transporter glutaminianu (GLT-1) może dojść do zwiększonego lub przedłużonego narażenia komórki na ten aminokwas. Innymi, związanymi z metabolizmem glutaminianu mutacjami genów są *DAO* (seryna, która jest substratem tego enzymu modyfikuje transmisję glutaminianu) czy *SOD1* (przez deregulację szlaku syntezy seryny). Ekscytotoksyczność jest mediowana przez wnikanie wapnia do komórki [97], na co bardziej podatne są motoneurony w rdzeniu kręgowym niż np. neurony okoruchowe [98]. Lek stosowany przyczynowo w ALS, czyli riluzol działa w mechanizmie zmniejszenia gromadzenia się glutaminianu w komórce [1,2].

D. Metabolizm glukozy i lipidów.

Utrata *SOD1* u myszy powoduje zaburzenia akumulacji glukozy i tłuszczów w wątrobie i mięśniach oraz ich wyrzut do krwi [98-100]. Mutacja *TARDBP* zmniejsza stężenie białka Tbc1d1 odpowiedzialnego za wychwytywanie glukozy, lipolizę oraz wrażliwość

na insulinę, u myszy powoduje szybką utratę tkanki tłuszczowej i śmierć [101-103]. U pacjentów z powtórzeniami *C9orf72* występuje zmniejszone stężenie glukozy w niektórych rejonach mózgu [104]. Innymi genami związanymi z ALS oraz metabolizmem energetycznym są *ERBB4* i *SQSTM1* (wychwyty glukozy) [30]. Pytaniem pozostaje, czy stwierdzane zaburzenia metaboliczne wynikają pierwotnie z mutacji (i wtedy wtórnie rozwija się choroba neuronów) czy są wtórne do występującego w ALS zaniku mięśni. Na pewno chorzy na ALS częściej niż w innych chorobach neurodegeneracyjnych prezentują cechy niealkoholowego stłuszczenia wątroby, a dyslipidemia wydaje się u nich czynnikiem protekcyjnym [105].

E. Nieprawidłową, zapalną aktywację komórek glejowych.

Komórki otaczające motoneurony (glejowe) odgrywają rolę w rozwoju i progresji ALS, co udowodniono w badaniach na gryzoniach z mutacją *SOD1* [68,106,107]. Rolą mikrogleju jest ochrona komórki nerwowej przed czynnikami infekcyjnymi/urazowymi oraz regulacja przewodnictwa synaptycznego [108,109]. Komórki te, nawet w stanie pozornego spoczynku, aktywnie skanują otoczenie, natomiast w momencie pojawienia się czynnika zagrażającego jak np. przerwanie bariery krew-mózg dochodzi do ich natychmiastowej aktywacji i włączenia mechanizmów ochronnych [109], związanych m.in. z proliferacją, wyrzutem cytokin zapalnych i narastaniem ogólnoustrojowej reakcji immunologicznej [71,110,111]. Do pobudzenia dochodzi także w obecności zagregowanych, patologicznych białek [71]. Pobudzone zapalnie komórki glejowe początkowo działają ochronnie, ale w miarę postępu choroby powodują uszkodzenie neuronów [112]. Szerzej temat zapalenia OUN omówiono w kolejnym podrozdziale.

F. Budowę cytoszkieletu oraz zaburzony transport aksonalny (związany m.in. z zaburzeniami budowy cytoszkieletu).

Jako pierwszą odkryto mutację *NFH* kodującego łańcuch ciężki neurofilamentów [113], następnie także *PFNI*, *VAPB*, *DCTN1*, *EPHA4* [68]. Na podstawie badań *SOD1* na modelu zwierzęcym stwierdzono, że transport organelli w obrębie aksonów jest zaburzony długo przed pojawieniem się objawów degeneracji neuronu i mogą być to dwa, niezależne od siebie procesy [114]. Mutacje w obrębie genów kodujących łańcuchy lekkie oraz ciężkie neurofilamentów, peryferynę czy dynektynę są obserwowane w ALS, choć jest to raczej rzadka przyczyna choroby [68,115,116]. Z drugiej strony podawanie czynników działających pozytywnie na wzrost aksonów (tu: VEGF) u szczurów z mutacją *SOD1* opóźniało moment pojawienia się objawów klinicznych [117]. Zaburzenia transmisji nerwowo-mięśniowej obserwowano także w mutacji *C9orf72* [118].

G. Uszkodzenie mitochondriów.

Dysfunkcje morfologiczne i biochemiczne w obrębie mitochondriów chorych na ALS były wielokrotnie opisywane [119]. W badaniach na transgenicznym modelu myszy z mutacją *G93A SOD1* stwierdzono, że ich mitochondria mają mniejszą pojemność magazynowania wapnia, a co za tym idzie z mniejszą skutecznością mogą buforować jego stężenie w komórce [120]. Komórki nerwowe są szczególnie wrażliwe na działanie wapnia z uwagi na małą pojemność jego buforowania oraz licznie występujące receptory AMPA zależne od wapnia, a także z uwagi na ekscytotoksyczność [121]. W ALS obserwowano również dysfunkcje oddychania komórkowego i produkcji ATP, zmiany w ekspresji genów zależnych od mitochondriów oraz zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu [122]. Ponadto, mutacja *SOD1* powoduje także zaburzenia transportu

mitochondrialnego oraz transportu organelli związanych z błoną komórkową wzdłuż aksonu [123]. Nieprawidłowe mitochondria i lizosomy mogą gromadzić się w proksymalnych częściach aksonów motoneuronów [122, 124].

H. Stres oksydacyjny.

Stres oksydacyjny jest związany najbardziej z mutacją genu *SOD1*, którego dysfunkcja powoduje zwiększenie ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Staje się to szczególnie istotne w sytuacjach jak np. uraz czy uszkodzenie bariery krew-mózg; w tych przypadkach mutacja powoduje zwiększenie podatności na uszkodzenia neuronów [66]. Poza dysmutazą ponadtlenkową u chorych z ALS obserwuje się również upośledzoną aktywność peroksydazy glutationowej oraz zwiększone stężenie MDA (co świadczy o nadmiernej lipoperoksydacji) [125].

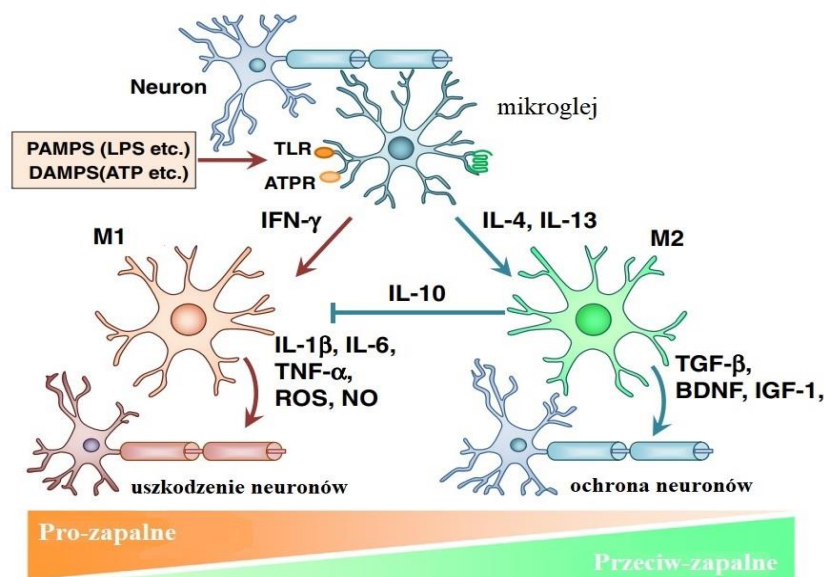
Wśród wymienionych, główne, aktualnie postulowane, mechanizmy patogenetyczne w ALS to defekt usuwania zagregowanych białek, defekt metabolizmu RNA oraz koncepcja „neurozapalenia” [14,87].

1.1.3.3. ZAPALENIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Zapaleniem nazywamy złożoną odpowiedź organizmu na zakażenie lub uszkodzenie, której celem jest zamknięcie infekcji w ograniczonym obszarze, eliminacja szkodliwych bodźców i przywrócenie homeostazy [126]. Angielskim terminem *neuroinflammation* określa się zapalenie OUN w którym bierze udział mikroglej oraz, w mniejszym stopniu, astrocyty i oligodendrocyty, co uznajemy za mechanizm należący do odporności wrodzonej, a także limfocyty związane z odpornością nabytą. W niektórych typach stanów zapalnych, np. w chorobach neurodegeneracyjnych dochodzi do utraty kontroli nad odpowiedzią zapalną, prawdopodobnie przez brak

możliwości usunięcia czynnika wyzwalającego [126,127]. Szereg reakcji biochemicznych i komórkowych prowadzi wtedy do aktywacji komórek glejowych [128]. Wiadomo, że *neuroinflammation* odgrywa rolę w patogenezie ALS [129]. Z definicji nie jest to jednak stan tylko szkodliwy, jest bowiem niezbędną częścią procesu zdrowienia.

Komórki mikrogleju mają pochodzenie mezenchymalne i są traktowane jako makrofagi układu nerwowego – są jego pierwszą linią obrony. W odpowiedzi na szkodliwe bodźce przechodzą ze stanu „monitorującego” w aktywny i wydzielają cytokiny prozapalne m.in. TNF α , interferon γ czy interleukinę 1 β oraz uwalniają reaktywne formy tlenu i tlenek azotu. W normalnych warunkach reakcja ta z czasem zostaje wygaszona przez cytokiny przeciwzapalne, również wydzielane przez mikroglej. Bieżąca funkcja tych komórek wydaje się zależeć od patogenu i środowiska zewnątrzkomórkowego, w szczególności od interakcji z otaczającymi astrocytami i limfocytami [130,131], ale także od wieku [129,132]. W związku z tym na początku XXI. wieku podzielono aktywację mikrogleju na klasyczny typ M1 uważany za prozapalny i neurotoksyczny oraz alternatywny M2 związany z odpowiedzią przeciwzapalną i neuroprotekcją, w tym z pobudzaniem wydzielania neurotrofin. Terminy te szeroko rozpowszechniono w pracach naukowych. Uważa się, że stymulacja w kierunku M1 następuje po kontakcie z wzorcami molekularnymi związanymi z patogenem (*ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) lub uszkodzeniem (*ang. damage-associated molecular patterns, - DAMP*), interferonem γ lub cytokinami limfocytów T pomocniczych typu 1, natomiast rozwój w kierunku M2 promują cytokiny limfocytów T pomocniczych typu 2 – Rycina 1.



Rycina 1. **Typy aktywacji mikrogleju.** PAMPS - wzorce molekularne związane z patogenem, LPS - lipopolisacharyd, DAMPS - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem, ATP - adenosynotrifosforanm TLR - receptor typu toll, ATPR - receptor ATP, IFN γ - interferon gamma, IL-4,-13,-10,-1 β ,-6 0 interleukiny-4,-13,-10,-1 β ,-6, TNF- α - czynnik martwicy nowotworów alfa, ROS - reaktywne formy tlenu, NO - tlenek azotu, TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta, BDNF - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego, IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu-1.

Za: Nakagawa Y., Chiba K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther.* 2015;154:21-35. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.06.010. [131].
Zmodyfikowano.

Klasycznie aktywowany mikroglej wydziela substancje prozapalne, a także zwiększa przepuszczalność bariery krew-mózg, co prowadzi do masowego nacieku komórek zapalnych z obwodu i przyczynia się do uszkodzeń neuronów i dysfunkcji sieci neuronowej. Alternatywnie aktywowany mikroglej hamuje działanie M1, pobudza przebudowę tkanek i wydziela substancje neurotroficzne, np. BDNF, co przyczynia się do przywrócenia homeostazy. [131,133]. W opinii badaczy dysregulacja M1-M2 może prowadzić do rozchwiania równowagi zapalnej OUN i powstania chorób takich jak ALS. Warto też podkreślić, że z wiekiem mikroglej w coraz większym stopniu przyjmuje stan prozapalny ze względu na zmniejszenie sygnalizacji spoczynkowej neuronów i astrocytów. W rezultacie bodźce zewnętrzne takie jak stres, uraz czy infekcja mogą

łatwiej wprowadzić starzejący się mózg w stan łagodnego przewlekłego zapalenia układu nerwowego, czyniąc go bardziej podatnym na sygnalizację apoptotyczną [129].

Pojawienie się nowych technologii pozwoliło stwierdzić, że sygnalizacja mikrogleju jest bardziej złożona, a jego komórki *in vivo* często współwyrażają markery charakterystyczne dla M1 i M2, bytując w wielu zróżnicowanych, dynamicznych i wielowymiarowych stanach aktywności. [128,134,135]. Mikroglej nie jest statyczny, ponieważ specyficznie reaguje na ciągłe zmiany w swoim lokalnym środowisku, a jego funkcje dostosowują się do lokalizacji i wzajemnych interakcji z pobliskimi komórkami i strukturami. Nie możemy więc jednoznacznie dokonać podziału tych komórek, a jedynie wydzielić wśród nich stany bardziej typowe dla fizjologii (w tym zależne od wieku, płci itp.) i dla konkretnych patologii. Badacze aktualnie dokonują tego za pomocą sygnatur transkrypcyjnych mikrogleju. Niektóre przykłady tych niestabilnych, zmiennych stanów z charakterystycznymi zestawami transkryptów to: mikroglej związany z chorobą (*ang. disease-associated microglia, DAM*), pierwotnie powiązany z modelami patologii choroby Alzheimera; mikroglej związany ze stanem zapalnym w stwardnieniu rozsianym (*ang. microglia inflamed in multiple sclerosis, MIMS*); mikroglej gromadzący kropelki lipidów (*ang. lipid-droplet-accumulating microglia, LDAM*) wykryty u starzejących się myszy i ludzi czy także mikroglej związany ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Należy pamiętać, że komórki prawdopodobnie nie są trwale zablokowane w żadnym pojedynczym statusie funkcjonalnym i że nie wiemy, czy jego zmiany są przyczyną choroby czy próbą odpowiedzi na czynnik patologiczny. Wiek ma kluczowy wpływ na stan homeostazy mikrogleju, który przechodząc przez kilka odrębnych etapów czasowych (mikroglej embrionalny, okołoporodowy, dorosły i „starzejący się”) charakteryzuje się innymi określonymi czynnikami regulacyjnymi i profilami ekspresji genów. Z upływem lat zmniejsza się heterogeniczność transkrypcyjna tych komórek i, co za tym idzie, ich

zdolność do reagowania na różne bodźce. W aktualnych rekomendacjach z 2022r. grupa ekspertów nie zaleca już wykorzystywania terminów M1 i M2. [132,134,136].

Niektórzy badacze rozważali rolę mikrogleju również w degradacji neuronów w ALS, co motywowano chociażby infiltracją makrofagów wytwarzających IL-1 β i TNF- α do rdzenia kręgowego chorych [131]. Już w pracy z 2004r. [137] w mózgu chorych na ALS odkryto wzmożoną, szeroko rozpowszechnioną aktywację mikrogleju, która na dodatek związana była z ciężkością objawów uszkodzenia GNR. Stwierdzono ją także w modelu zwierzęcym choroby, gdzie pojawiała się jeszcze przed wystąpieniem symptomów [138,139].

Szczególną uwagę zwraca tutaj znana w ALS mutacja genu *SOD1*. Mikroglej wykazujący nadekspresję SOD1G93A, zarówno in vitro jak i w modelu zwierzęcym, indukuje śmierć neuronów ruchowych oraz zmniejsza liczbę i długość neurytów w porównaniu z mikroglejem typu dzikiego, wykazując cechy aktywacji M1 – zmniejszenie produkcji IGF-1, a zwiększenie uwalniania TNF- α , IL-6, IL-1 β , reaktywnych form tlenu i tlenku azotu [71,131,140]. Z drugiej strony aktywne zredukowanie ekspresji *SOD1* w tych komórkach u transgenicznych myszy wydłuża przeżycie pacjentów [141,142]. Ostatecznie dowiedziono, że we wczesnej fazie choroby poziom markerów M2 w rdzeniu kręgowym ulega zwiększeniu, co wskazuje, że reaktywny mikroglej wykazuje fenotyp sprzyjający naprawie i regeneracji, natomiast w późnej fazie ALS dominują cechy M1 wydzielającego cytokiny prozapalne, które nasilają zapalenie nerwów i zwyrodnienie. Wydaje się, że same umierające komórki nerwowe mogą powodować niekorzystną dla nich zmianę aktywacji mikrogleju, który z czasem trwania schorzenia zwiększa wielkość i ilość ziarnistości komórkowych. W komunikacji między glem, a neuronami mogą pośredniczyć m.in. neurotrofiny [128,140,142,143].

Także w przypadku najczęstszej w ALS mutacji C9orf72 dochodzi do dysfunkcji mikroglejowej w postaci zwiększonej odpowiedzi zapalnej oraz zmniejszonej zdolności do usuwania zagregowanych białek, a co za tym idzie zwiększonej degeneracji neuronów i szybszego postępu choroby. [49,60]. Zmutowane formy TDP-43 biorą udział w aktywacji mikrogleju i zwiększaniu ekspresji czynników prozapalnych, takich jak m.in. TNF- α czy IL-1 β [144]. W obu tych mutacjach dodatkowo pacjenci tracą zdolność do regulowania produkcji interferonu poprzez wrodzony układ odpornościowy, co może prowadzić do ogólnoustrojowego zapalenia. Spośród innych genów, o których wiemy, że są związane z ALS, wiele również bierze udział w ścieżkach patogenetycznych związanych ze stanem zapalnym, m.in. *OPTN*, *SQSTM1*, *TBK1* czy *VCP*. [49]. Ponadto dysfunkcja mitochondriów, postulowana jako jedna z możliwych przyczyn ALS, powoduje zmniejszenie polaryzacji mikrogleju w kierunku M2 [145].

W związku z ww. doniesieniami podejmowano próby leczenia poprzez wpływ na linię makrofagów/mikrogleju uzyskując częściowy sukces w postaci spowolnienia postępu choroby w wybranych grupach pacjentów [146]. Co więcej, okazało się, że modyfikacja obwodowych makrofagów ma wpływ na aktywność mikrogleju ośrodkowo i może przedłużać życie chorych [147].

Podobnie, aktywację astrocytów dzielono do tej pory na stan A1 (neurotoksyczny) lub A2 (neuroprotekcynny) [133]. Zaobserwowano, że czynnik wzrostu fibroblastów 1 (*ang. fibroblast growth factor -1*, *FGF-1*), wydzielany przez neurony ruchowe przy stresie oksydacyjnym, indukuje cytotoksyczną aktywację astrocytów. Zmiana fenotypu na neurotoksyczny jest powiązana z upośledzeniem astroglejowego transportera glutaminianu w ALS. Z drugiej strony komórki mogą też odgrywać rolę ochronną wydzielając czynniki wzrostu i zwiększając poziom GLUT1, redukując w ten sposób glutaminian [71]. Odmienne funkcje w dużym stopniu są zależne od interakcji

z mikroglejem m.in. poprzez TNF- α [148]. Oligodendrocyty, jako takie, wydają się nie mieć istotnego związku w patogenezie ALS, ulegają natomiast w jego przebiegu degeneracji dając mniejsze podparcie neuronom [68].

1.1.3.4 CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE

Termin ekspozom oznacza narażenie pacjenta na czynniki środowiskowe przez całe jego życie. Coraz częściej uwzględnia się jego rolę w patogenezie ALS, zwłaszcza przy zwiększaniu ryzyka zachorowania, jak i przyśpieszeniu progresji choroby [149].

1.1.3.4.1 Wirusy

Na przełomie XX i XXI wieku pojawiły się badania dotyczące wpływu przewlekłej infekcji wirusowej na patogenezę ALS [32]. W jednym z nich okazało się, że w surowicy pacjentów z ALS, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej znacznie częściej wykrywano aktywność odwrotnej transkryptazy (59% do 3%). Nie stwierdzono jednak obecności żadnego ze znanych retrowirusów [150]. W innym badaniu, również znamienne częściej wykrywano enterowirusowe RNA w obrębie zamrożonej tkanki pochodzącej z rdzenia kręgowego chorych [151]. W ciągu kolejnych lat opisywano przypadki pacjentów zarażonych wirusem HIV, którzy rozwijali ALS lub zespół objawów przypominających ALS [152] i których stan kliniczny i neurologiczny poprawiał się przy podaży leków antyretrowirusowych [152,153]. Wysłunięto hipotezę, że nie tylko egzogenna infekcja wirusowa, ale też aktywacja jednego z ludzkich, endogennych retrowirusów (HERV-K) może odgrywać rolę w patogenezie choroby, być może jeden mechanizm powoduje włączenie drugiego [153,154]. Co istotne, ekspresja HERV-K jest regulowana przez TDP-43 [154]. Infekcja wirusowa w ALS ma związek

z zapaleniem OUN oraz aktywacją czynników zapalnych, m. in. interleukin, co udowodniono dla IL-10, IL-6 oraz IL-1B [153].

1.1.3.4.2 Toksyny

Wykryto kilka ognisk endemicznego występowania ALS, po raz pierwszy na wyspie Guam, następnie również w Nowej Gwinei oraz w USA, gdzie powiązano chorobę z narażeniem na toksynę wytwarzaną przez cyjanobakterie, β -metyloamino-L-alaninę (BMAA). Zamieszkający wyspę Guam lud Czamorro, jak się okazało, spożywał mąkę wytworzoną z nasion rodzimej rośliny z grupy sagowców (*Cycas micronesica*) z symbiontem w postaci cyjanobakterii. W trakcie produkcji mąki toksyna ulega koncentracji, a następnie gromadzi się w tkance mózgowej chorych [30,155] działając toksycznie w kilku różnych mechanizmach (m.in. poprzez wpływ na nieprawidłowe składanie białek czy tworzenie agregatów, być może poprzez wpływ na inkorporację tego aminokwasu do genu *SOD1*) [64,156]. Ekspozycja na BMAA daje kliniczne objawy z grupy ALS, ale też choroby Parkinsona oraz otępienia [30,157].

Wpływ nikotynizmu nie jest jednoznacznie potwierdzony, na pewno występuje związek z występującymi w papierosach ołowiem, pestycydami, a także kadmem oraz formaldehydem, które zmniejszają aktywność *SOD1* [30,158].

Badania dotyczące całonocnego spożycia alkoholu mogą wskazywać natomiast na jego potencjalne działanie ochronne [158,159].

Także narażenie na pestycydy i zawarte w nich związki fosforoorganiczne powoduje nieodwracalne hamowanie acetylocholinesterazy, a co za tym idzie uszkodzenie motoneuronów [160].

Ponadto wykazano, że wysokie osoczowe stężenie trwałych zanieczyszczeń

organicznych wiąże się z niezależnym od innych czynników zmniejszonym przeżyciem chorych z ALS [149,161].

1.1.3.4.3 Metale

Dyshomeostaza żelaza powodująca jego nagromadzenie w mózgu powoduje zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu oraz neurodegenerację [162-164], w badaniach na gryzoniach związki chelatujące miały tu działanie neuroprotektoryjne [165].

Wyższe stężenia ołowiu we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz polimorfizm genu związanego z jego metabolizmem były obserwowane u pacjentów z ALS, jednakże ekspozycja na małe dawki metalu wiązała się z dłuższym przeżyciem, co kojarzono ze zwiększoną ekspresją *VEGF* i zmniejszoną astrocytozą [30,166].

Przewlekłe narażenie na rtęć daje w obserwacji klinicznej objawy podobne do tych w klasycznym ALS i zwiększa ryzyko wystąpienia choroby [30]. W badaniu ze znakowaną rtęcią okazało się, że już po pojedynczej dawce pierwiastek gromadzi się w neuronach ruchowych zarówno w mózgowiu, jak i rdzeniu kręgowym myszy [167]. Ponadto metal ten wpływa na funkcję i interakcje komórek glejowych powodując m.in. zmniejszone wydzielanie IL-6. Nie wykazano wpływu na IL-1B i TNFa [168].

Wpływ nadmiaru selenu na selektywne uszkodzenie motoneuronów omówiono w badaniach na zwierzętach i ludziach [30]. Stwierdzono, że narażenie na selen powoduje translokację dysmutazy ponadtlenkowej do mitochondrium, gdzie dochodzi do akumulacji enzymu [169]. Zwiększony stres oksydacyjny powoduje stopniową degenerację cholinergicznym motoneuronów [170].

Innym metalem zwiększającym stres oksydacyjny, ale wpływającym również na transmisję glutaminergiczną i mającym przez to efekt neurotoksyczny jest cynk [171].

Wiadomo jednak, że cynk jest konieczny do prawidłowego działania *SOD1* [172] - w przypadku jego braku pozostająca w enzymie miedź staje się neurotoksyczna przez generację tlenu azotu [173]. Badania dotyczące suplementacji cynku w ALS są rozbieżne [172,174].

1.1.3.4.4 Inne czynniki

Inne czynniki, które badano pod kątem wpływu na patogenezę ALS to: pole elektromagnetyczne o niskiej częstotliwości (może indukować stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA i apoptozę, ale zdania co do zwiększania ryzyka ALS są podzielone [30,175]); wysiłek fizyczny (generuje stres oksydacyjny - wśród profesjonalnych sportowców występuje więcej chorych na ALS, ale umiarkowany wysiłek ma działanie ochronne [176-178]); bilans energetyczny (niższe BMI daje większe ryzyko zachorowania) [158,159,179]; dyslipidemia (duże stężenie cholesterolu całkowitego koreluje z wyższym ryzykiem zachorowania i wyższą śmiertelnością chorych [159,180,181], natomiast wysokie stężenie triglicerydów zmniejsza tę śmiertelność [180]), gromadzenie się ceramidów, kwasu arachidonowego i lizofosfatydylocholiny jest zwłaszcza szkodliwe dla neuronów ruchowych [181]).

1.1.3.5 PATOGENEZA - PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę całość skomplikowania procesów patogenetycznych mogących prowadzić do wystąpienia choroby nie dziwi fakt braku jednoznacznych konkluzji co do jej przyczyn. Ponadto cały czas występują małe ogniska endemiczne, których znaczenia nie potrafimy wyjaśnić, jak np. wzrost liczby zachorowań na ALS u weteranów wojny w Zatoce Perskiej w 1991r. [182,183] – sugerowano tu związek z mykobakteriami [184], ale także z BMAA pochodzącą z pyłu pustynnego [185].

Choroby neuronu ruchowego, a w szczególności ALS pozostają dużym wyzwaniem zarówno dla systemu opieki medycznej oraz społecznej, jak i dla pojedynczej jednostki. Kluczowe wydaje się poznanie patogenezы choroby. Chociaż znamy już wiele procesów zachodzących na poziomie komórkowym, nie wiemy jak połączyć je w ciąg przyczynowo-skutkowy, który w przyszłości mógłby pomóc w odkryciu skutecznej terapii ALS. Publikacji dotyczących znaczenia procesu zapalnego OUN w patogenezie ALS pojawia się w ostatnich latach coraz więcej, nadal jednak wydają się one błędziem po omacku, wśród być może przypadkowych odkryć. Pozostaje nadzieja, że większa ilość badań i dowodów pozwoli ostatecznie ustalić przyczynę choroby i skutecznie ją leczyć.

1.2 BADANE MARKERY ZAPALNE KRWI OBWODOWEJ

1.2.1 Białko C-reaktywne (CRP)

Białko C-reaktywne to obecnie jedna z najczęściej oznaczanych w osoczu protein, po raz pierwszy wyizolowana w 1930r. u pacjentów chorych na zapalenie płuc [186]. Substancja jest produkowana w zdecydowanej większości w wątrobie pod kontrolą głównie interleukiny-6, ale sugerowano także inne miejsca lokalnej produkcji i sekrecji CRP, w tym także komórki piramidowe mózgu oraz komórki immunologiczne, m.in. limfocyty i makrofagi [187-189]. CRP należy do tzw. białek ostrej fazy; jego poziom wzrasta niespecyficznie w stanach zapalnych, infekcjach, uszkodzeniach mechanicznych tkanki, a także w nowotworach. W badaniu Pepys i Hirschfield [187] u młodych, zdrowych dorosłych mediana stężenia CRP w osoczu krwi wyniosła 0,8 mg/l, w 99 centylu z wartością 10 mg/l. Z wiekiem stężenie CRP we krwi zauważalnie się zmienia. Wykazano, że rośnie zauważalnie u kobiet po 50 rż., by następnie kontynuować już stabilną tendencję wzrostową, podczas gdy u mężczyzn wzrost od początku jest stabilny, ale większy [190]. Największe różnice zauważono w grupach wiekowych 50-64 (średnio 2.3 mg/l u kobiet i 1.8mg/l u mężczyzn) oraz 85+ (3.3 mg/l u kobiet i aż 5.4mg/l

u mężczyzn) [190]. W schorzeniach o ostrym przebiegu wartości CRP mogą być zwielokrotnione nawet 10 tys. razy. W chorobach przewlekłych wzrastają one skromniej, ale nadal znacząco i konsekwentnie [191].

W zakresie działania na układ immunologiczny CRP może wykazać właściwości pro- i antyzapalne. Wiążąc się m.in. z fosfolipidami czy fosfocholimą białko to pomaga w identyfikacji i usuwaniu patogenów oraz uszkodzonych lub przeznaczonych do apoptozy komórek. Dodatkowo, również w tym celu, aktywuje klasyczną drogę dopełniacza i komórki fagocytarne. Jeśli działanie to wywoływane jest przez autoprzeciwciała staje się ono częścią patogenezy chorób autoimmunologicznych. Ponadto, CRP reguluje wyrzut cytokin i chemotaksję [189,192].

Białko C-reaktywne poza swoją wartością diagnostyczną, wykazuje również potencjał prognostyczny, m.in. w chorobach neurozwyrodnieniowych (AD, PD). Zasugerowano, że stan zapalny zarówno poprzedza rozpoznanie, jak i rozwija się przy postępującej neurodegeneracji.

1.2.2 Fibrynogen

Fibrynogen to glikoproteina osocza krwi należąca do grupy czynników krzepnięcia, tzw. I czynnik krzepnięcia. W kaskadzie krzepnięcia fibrynogen, w odwracalnym procesie, jest enzymatycznie przekształcany w fibrynę, która współtworzy skrzep krwi. Białko produkowane jest w wątrobie, choć prawdopodobnie bardzo małe ilości fibrynogenu może wydzielać także endotelium. [193,194]. Synteza regulowana jest przez cytokiny - pobudzana przez interleukinę 6, a hamowana przez interleukinę 1β oraz $\text{TNF-}\alpha$, z drugiej strony sam fibrynogen ma właściwości prozapalne i promiażdżycowe [195]. Stężenie fibrynogenu, jako białka ostrej fazy, może wzrosnąć 2-4 krotnie, osiągając maksymalne stężenie w trzecim dniu po stymulacji [196].

Wyodrębniono wiele czynników mogących podwyższać stężenie fibrynogenu w osoczu. Są to m.in. wiek, pochodzenie etniczne, płeć żeńska, palenie papierosów i spożycie alkoholu, nadciśnienie tętnicze, otyłość, zaburzenia metaboliczne w tym lipidowe i cukrzyca, doustna antykoncepcja czy menopauza [195]. Szczególnie zwraca się uwagę na powiązanie białka z miażdżycą i ryzykiem sercowo-naczyniowym, w tym ostrymi epizodami niedokrwieniami serca i mózgu [197,198].

W warunkach fizjologicznych fibrynogen w OUN praktycznie nie występuje, pojawia się dopiero w wyniku przerwania ciągłości bariery krew-mózg i może być wykorzystywany jako marker takiej dysrupcji. Wydawałoby się, że samo stężenie fibrynogenu jest efektem rozwijającego się stanu zapalnego, nie zaś czynnikiem sprawczym. Okazuje się jednak, że wyniki w tym zakresie nie są jednoznaczne. Badania z wykorzystaniem myszy pozbawionych genetycznie tego białka sugerują przyczynową rolę fibrynogenu w zapaleniu OUN. Działa on wtedy jako aktywator ścieżek sygnałowych odporności wrodzonej (przez aktywację receptorów integrynowych CD11b/CD18 na komórkach mikrogleju oraz pobudzenie migracji makrofagów do OUN) oraz mediator neurodegeneracji. Białko to wywiera negatywny wpływ także poprzez hamowanie remielinizacji po uszkodzeniach neuronów, hamowanie regeneracji aksonów (astrocytoza), promowanie wytwarzania glejowej tkanki bliznowatej oraz stanu zapalnego OUN. [199-201]. W 2012r. opublikowano wyniki pracy, w której podawano fibrynogen bezpośrednio do tkanki mózgowej zdrowej myszy. W ciągu zaledwie 30 minut powodowało to utrzymujące się wzbudzenie mikrogleju i sekrecję chemokin. Taki efekt był obserwowany unikalnie dla tej substancji. [202]. W efekcie obserwowano cechy demielinizacji, co nazwano wywołanym przez fibrynę zapaleniem mózgu i rdzenia (*ang. fibrin-induced encephalomyelitis, FIE*) [203].

Depozyty fibryny badacze odnajdują w mózgu osób dotkniętych wieloma schorzeniami neurologicznymi [204]. Fibrynogen i składniki kaskady krzepnięcia mogą służyć jako klinicznie istotne biomarkery osocza i płynu mózgowo-rdzeniowego do diagnozowania i śledzenia postępu choroby neurologicznej.

Generalnie przyjmuje się, że przewlekłe uszkodzenie bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy z towarzyszącą niesprawnością transportu śródbłonkowego lub nieprawidłową sygnalizacją perycytów, jest związane ze zwiększonym okołonaczyniowym odkładaniem fibryny i następnie, postępującą neurodegeneracją. U myszy z mutacją perycytów poprzedza ono deficyty behawioralne, co sugeruje, że wejście fibrynogenu do OUN jest krytycznym czynnikiem inicjującym lub nasilającym procesy zwyrodnieniowe po uszkodzeniu naczyń. [201,205].

1.2.3 Leukocyty

Morfologia krwi to najprostsze i najczęściej wykonywane badanie laboratoryjne. Leukocyty, których podstawową funkcją jest obrona organizm, są produkowane w szpiku kostnym. Są najbardziej różnorodnym składnikiem morfotycznym krwi, jeśli chodzi o typy i funkcje [206]. W zakresie markerów zapalenia OUN interesują nas tu w pierwszej kolejności neutrofile, limfocyty oraz stosunek tych dwóch frakcji, tzw. wskaźnik neutrofilowo-limfocytowy (*ang. neutrophil-lymphocyte ratio, NLR*).

Opisywanie ogólnych zastosowań diagnostycznych leukocytów leży poza granicami tej dysertacji, skupię się tu przede wszystkim na doniesieniach dotyczących ALS.

W ciekawym badaniu oceniającym związek leukocytów i ALS u myszy, obserwowano wywołaną nadekspresją TDP-43, jednego z genów związanych z patogenezą choroby, znaczący wzrost infiltracji limfocytów T CD3+ i CD4+ do OUN.

Gdy dodatkowo gryzonie poddano działaniu lipopolisacharydu mającego symulować ogólnoustrojowe zapalenie niskiego stopnia, doszło do znacznego zwiększenia się infiltracji neutrofilów. Mogłoby to sugerować, że działanie TDP-43 jest związane z przepuszczalnością bariery krew-mózg [207]. Ponadto, w jednym z badań okazało się, że pacjenci z mutacją *C9orf72C9* mają zmieniony immunofenotyp, co nie pozwala na wytłumienie stanu zapalnego [208].

1.2.3.1 NEUTROFILE

Neutrofile, stanowią 60-70% wszystkich krążących leukocytów, co czyni je najliczniejszą i najbardziej podatną na zwiększenie ilości grupą. Pełnią szerokie spektrum funkcji, w tym odpowiadają za fagocytozę mikroorganizmów, uwalnianie prozapalnych cytokin i chemokin czy tzw. wybuch oksydacyjny. Są podstawowym elementem tzw. odporności wrodzonej. Zwykle to one jako pierwsze reagują na infekcję lub uraz, mają też zdolność przenikania bariery krew-mózg [209]. Przyczyny wzrostu neutrofilii mogą być pierwotne, najczęściej w chorobach rozrostowych szpiku, czy po splenektomii oraz wtórne, najczęściej w infekcjach, ale również w: przewlekłych stanach zapalnych, chorobach nowotworowych, jako konsekwencja przyjmowania leków, czy w związku z wpływem czynników środowiskowych, tj. palenie papierosów, stres, aktywność fizyczna. Neutropenia natomiast może być wywoływana jatrogenie, głównie w leczeniu chorób rozrostowych, ale wpływ mogą tu mieć także czynniki toksyczne (np. alkohol, głódzenie), czy dysfunkcje szpiku lub układu immunologicznego. [206,209,210].

Najliczniejsze publikacje dotyczące związku liczby neutrofilów z chorobami neurologicznymi dotyczą udaru niedokrwienego mózgu [209,211,212].

W pracy Trias et al. [213] opisującej wyniki badań autopsyjnych mięśni czworogłowych uda pacjentów z ALS stwierdzono obecność licznych neutrofilów

śródmięśniowych wykazujące ekspresję elastazy; komórek tych nie stwierdzono w grupie kontrolnej. Dodatkowo ich liczba korelowała z liczbą komórek tucznych. Granulocyty nawiązywały bezpośredni kontakt z włóknami mięśniowymi tworząc wielokomórkowe skupiska, wchodziły w interakcję z komórkami tuczными i generowały duże pułapki zewnątrzkomórkowe (NET) prowadząc do odnerwienia połączeń nerwowo-mięśniowych i atrofii mięśni. W tej samej pracy zbadano szczury z mutacją *SOD1*, u których wykryto agregaty obu typów komórek wokół aksonów ruchowych w mięśniu prostownika długim palców, nerwie kulszowym i korzeniach brzusznych. Sugeruje to, że naciek komórek odpornościowych rozciąga się wzdłuż całej obwodowej ścieżki ruchowej. Ponadto stwierdzono wzrost liczby neutrofilów w toku choroby [213]. Inne badanie sugerowało możliwość udziału neutrofilów w procesach naprawczych [214].

1.2.3.2 LIMFOCYTY

Limfocyty stanowią ok. 30% wszystkich leukocytów we krwi, ale znacznie większą ich ilość znajdziemy w układzie limfatycznym. Dzielimy je wg typów o różnym zakresie funkcji – T pomocnicze (typu Th1 i Th2, CD4+) wspomagające odpowiedź immunologiczną w kontakcie z komórkami prezentującymi antygen i produkujące cytokiny, T cytotoksyczne (CD8+) odpowiedzialne za bezpośrednie niszczenie patologicznych komórek, T regulatorowe hamujące reakcje odpornościowe i autoimmunologiczne; limfocyty B produkujące przeciwciała związane z konkretnymi antygenami; limfocyty NKT o właściwościach pośrednich między komórkami T i NK. [215]. Komórki NK niegdyś należały do limfocytów, są również naturalnie cytotoksyczne i regulujące reakcje immunologiczne. Każda z subpopulacji ma charakterystyczne markery różnicowania komórkowego, które może także nabywać w różnych sytuacjach, np. ze starzeniem się organizmu [216]. Limfocytozę najbardziej powszechnie wiąże się

z ostrą infekcją, ale wykrywa się ją także z osób z chorobami limfoproliferacyjnymi, zapaleniami przewlekłymi czy po splenektomii. Z drugiej strony, limfocytopenia może być powodowana przez wrodzone i nabyte niedobory odporności, niektóre typy infekcji, choroby autoimmunologiczne, przewlekłą chorobę nerek czy alkoholizm.

W przeciwieństwie do granulocytów, rola większości limfocytów T w ALS wydaje się raczej pozytywna, ale zależy to w dużym stopniu od ich subpopulacji. Już w 1992r. w badaniach sekcyjnych odkryto akumulację limfocytów T i reaktywnych form mikrogleju w rogach przednich chorych na ALS [217]. W 2008r. Beers et al. opisali u myszy z mutacją SOD1, neuroprotekcijną, zwiększającą potencjał ochronny i osłabiającą reakcje toksyczne mikrogleju promując jego przejście w stan M2, funkcję limfocytów CD4+ [218]. W kolejnych pracach tych samych autorów [142,219] dowiedziono, że liczba endogennych limfocytów T regulatorowych w rdzeniu kręgowym myszy zwiększa się we wczesnych, wolno postępujących stadiach, gdy dochodzi do podniesienia poziomu ekspresji interleukiny-4 i pobudzenia funkcji ochronnego mikrogleju M2, a zmniejsza się na korzyść komórek Th1, gdy choroba gwałtownie przyspiesza – wtedy dominuje fenotyp M1. Również u ludzi poziom regulatorowych limfocytów T był odwrotnie skorelowany z szybkością postępu choroby. Poziom tych komórek we krwi jest niższy niż w grupie kontrolnej [220]. Ponadto, transfer komórek CD4+ typu dzikiego do myszy z ALS pozbawionych funkcjonalnych limfocytów T przedłużał przeżycie, ale tylko w początkowej fazie schorzenia. Odwrotny, szkodliwy efekt w postaci przyspieszenia postępu choroby miało genetyczne usunięcie limfocytów T CD4+. [142,218,221]. Podejmowano także próby podawania limfocytów T regulatorowych myszom i ludziom z ALS (czasami łącznie z interleukiną 2) uzyskując znacząco dłuższe przeżycie, ale przede wszystkim udowadniając bezpieczeństwo takiego działania, co pozwala kontynuować badania [222,223]. Limfocyty B natomiast nie

wydają się mieć istotnego znaczenia w ALS. Co prawda, w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym chorych wykrywa się autoprzeciwciała przeciw antygenom neuronalnym, ale nie stwierdzono ich roli przyczynowej w chorobie [224]. Brak dojrzałych komórek B u myszy SOD1 nie zmieniał postępu schorzenia [225].

1.2.3.3 WSKAŹNIK NEUTROFILOWO-LIMFOCYTOWY

NLR, to iloraz liczby granulocytów obojętnochłonnych i limfocytów, służący do określania istnienia subklinicznego stanu zapalnego. W praktyce wskaźnik ten stosuje się jednak nie tyle w chorobach zapalnych, co jako marker prognostyczny – w chorobach sercowo-naczyniowych [226] i nowotworach [227]. Wyższe wartości wiąże się zwykle z gorszą prognozą. Nie ustalono „wartości prawidłowej” NLR, natomiast w dużym badaniu na populacji Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej jego średnia wartość wyniosła 2,15 [228]. Wykorzystanie omawianego wskaźnika zamiast bezwzględnych wartości neutrofilów i limfocytów ma wiele plusów. Łączy informacje dotyczące obu subtypów leukocytów, ale przede wszystkim pozwala uniknąć zafałszowania wyników związanego np. z infekcją, genetyczną predyspozycją immunologiczną czy stanem nawodnienia danego pacjenta [229].

Próby oszacowania wskaźnika NLR, jako biomarkera, podejmowano w wielu schorzeniach neurologicznych [212,230-238].

1.3 BADANE MARKERY PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

Prawidłowy rozwój i funkcjonowanie tkanki nerwowej wymagają współdziałania wielu czynników. Neurotrofiny (*ang. neurotrophins, NT*) to grupa białek należących do rodziny czynników wzrostu, które stymulują neurogenezę oraz regenerację istniejących komórek nerwowych, przez co warunkują prawidłowe funkcjonowanie OUN [239].

W trakcie embriogenezy występują nadprodukcja, a następnie obumieranie większości wytworzonych neuronów (szacuje się, że ginie nawet 80%), co zależne jest od konkurowania między komórkami o dostęp do ograniczonej ilości substancji neurotroficznych [240]. W dalszym okresie życia NT regulują procesy naprawcze w samym neuronie, jak i obwodach neuronalnych.

Wszystkie NT syntetyzowane są w retikulum endoplazmatycznym jako białka prekursorowe (proNT), a następnie przetwarzane przez różne proteazy do swojej dojrzałej formy, która trafia do pęcherzyków wydzielniczych w aparacie Golgiego [241]. Istotnym wydaje się fakt, że działanie na komórki docelowe NT i proNT może być przeciwstawne – forma prekursorowa po związaniu z koreceptorem (sortyliną) ma większe powinowactwo do niespecyficznego receptora p75 (z grupy receptorów TNF – czynnika martwicy nowotworów, o niskim powinowactwie), który może promować apoptozę, a forma dojrzała do specyficznego, błonowego receptora Trk (receptory z kinazą związaną z tropomiozyną, o wysokim powinowactwie), promującego przeżycie neuronów [239,242,243]. Dodatkowo, aktywacja p75 również może dawać przeciwstawne rezultaty w zależności od ligandu, białek pośredniczących czy innych receptorów w danej lokalizacji. Skutki tego działania mogą różnić się także w obecności Trk (brak tego receptora kierował kieruje ścieżki sygnałowe w kierunku pro-apoptotycznym) [243]. Upośledzenie powstawania i transportu NT, a także nieprawidłowości ekspresji receptorów są zaznaczone w wielu chorobach OUN, zwłaszcza związanych z otępieniem [244,245]. Nadekspresja receptora p75 jest wyraźna w motoneuronach także np. przy uszkodzeniu nerwu kulszowego [246].

Interakcje pomiędzy NT, a układem immunologicznym są złożone, ale za ich podstawę uznaje się fakt ich wzajemności – komórki odpornościowe mają zdolność zarówno wydzielania NT, jak i ekspresji ich receptorów, a tym samym NT mogą działać

jako cytokiny wpływające i regulujące rozwój układu odpornościowego. Aktywowane limfocyty produkując NT działają ochronnie na tkankę nerwową. NT natomiast nie tylko reagują na miejscowe bodźce zapalne, ale mają także zdolność ich promowania poprzez aktywację i uwalnianie komórek, cytokin i mediatorów prozapalnych. Stąd, możemy sądzić, że odgrywają one istotną rolę jako kluczowe elementy niezbędne do wytworzenie kompetentnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. [247-249].

Do klasycznych NT należą: czynnik wzrostu nerwów (*ang. nerve growth factor, NGF*), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (*ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF*), neurotrofina 3 (*ang. neurotrophin-3, NT-3*) i neurotrofina 4/5. Czynniki neurotroficzne to szersza grupa substancji, w której znajdziemy również neurotroficzne czynniki pochodzenia glejowego oraz tzw. neurokiny, czyli cytokiny neuropoetyczne (m.in. czynnik martwicy nowotworów alfa, *ang. tumor necrosis factor alpha, TNF α*). [239,240].

Z uwagi na ich działanie proregeneracyjne podejmowano próby podawania neurotrofin chorym na ALS, ale bez istotnych korzyści [250-252]. Może to wynikać ze zmniejszonej ilości receptorów o wysokim powinowactwie w obszarach ruchowych rdzenia kręgowego pacjentów [253,254]. W badaniu Zhong et al. podawanie NT wraz z neuralnymi komórkami macierzystymi ALS (+) myszy poprawiło ich funkcje ruchowe i przeżycie [255].

1.3.1 Czynnik wzrostu nerwów

NGF to pierwsza zidentyfikowana substancja z rodziny neurotrofin, wyizolowana w 1954r., działająca poprzez receptor Trk typu A oraz poprzez wiązanie się z niskim powinowactwem przez receptor p75 [239-241,256]. NGF bierze udział w przekazywaniu impulsów czuciowych i współczulnych, dotyczących szczególnie różnicowania,

regeneracji i percepcji doznań bólowych, ponadto promuje wzrost aksonów i dendrytów oraz ogólnie pojętą neuroplastyczność [256,257]. W OUN neurony wrażliwe na NGF oraz go produkujące są zlokalizowane w podstawnej części przodomózgowia, prążkowiu, wzgórzu, hipokampie i kilku obszarach korowych, ale nie tylko one są w stanie wytworzyć tego czynnika. Dotyczy to także astrocytów oraz mikrogleju. W przypadku komórek glejowych produkcja NGF zwiększa się w obecności lokalnego stanu zapalnego, uszkodzenia mechanicznego oraz pod wpływem cytokin prozapalnych. Receptory dla NGF znaleziono także w komórkach skóry, endotelium, gruczołów ślinowych, tarczycy, przysadki czy w jajnikach [256].

Ponadto, receptory TrkA wykazują ekspresję na ludzkich limfocytach T CD4+, kluczowych dla układu odpornościowego i modulujących odpowiedź zapalną, na komórkach tucznych oraz makrofagach. Przy ich pobudzeniu dochodzi do generacji cytokin, wspomagane jest także tworzenie przeciwciał przez limfocyty B, indukcja komórek tucznych i bazofilów, promowanie aktywacji makrofagów, reakcji nadwrażliwości czy wzmaganie działania układu dopełniacza. Komórki układu immunologicznego same mogą wydzielać NGF, co może wskazywać na obecność obwodu autokrynnego. Zwiększone osoczowe stężenie NGF zaobserwowano w schorzeniach zapalnych, m.in. twardzinie układowej, toczeniu rumieniowatym układowym, astmie, alergiach, zapaleniach spojówek, zapaleniach stawów. [257-259].

Warto także wspomnieć, że NGF może indukować ekspresję TNF alfa, który zwykle ma działanie proapoptotyczne przez receptor TNFR1. W obecności NGF jednak TNF alfa preferencyjnie aktywuje inną drogę – poprzez TNFR2 promuje przeżycie komórki. Wydaje się, że obie substancje mogą modulować swoje działanie tak by uzyskać fizjologiczny balans. Dlatego też całkowite wyciszenie stanu zapalnego może

nieść ze sobą nieprzewidziane konsekwencje z uwagi na brak pobudzenia takich receptorów jak TNFR2 [260].

1.3.2 Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

BDNF, działa poprzez receptor Trk typu B oraz wiążąc się z niskim powinowactwem także przez receptor p75 [240,261,262]. Jego wyjątkowość w rodzinie neurotrofin polega na wielu możliwościach zmiennych w procesie transkrypcji, co pozwala na wytworzenie 22 różnych wariantów tego czynnika, specyficznych dla danej tkanki i odpowiadających na inne bodźce. ProBDNF przekształca się w BDNF w większości pozakomórkowo, co sprawia, że rola samego białka prekursorowego jest równie ważna, co dojrzałego; istotny wydaje się także stosunek stężeń tych protein [262-264].

W OUN czynnik ten lokalizuje się praktycznie w całym mózgu, zwłaszcza w obrębie hipokampu i kory mózgowej (rejony podstawne przedomózgowia); poza OUN możemy go znaleźć także w siatkówce, sercu, nerkach, mięśniach, grasicy czy gruczole krokowym [129,240]. BDNF okazuje się niezbędny do prawidłowego procesu neurogenezy – homozygoty poddane mutacji typu „kick-out” wykazywały poważne ubytki neurologiczne lub umierały w ciągu kilku dni/tygodni mimo braku wyraźnych makroskopowych cech uszkodzenia OUN [265]. W dojrzałym mózgu proBDNF i BDNF biorą udział w regulacji neuro-, glio- i synaptogenezy, neuroprotekcji, regeneracji, promowaniu neuroplastyczności, tworzeniu osłonki mielinowej oraz kontroli interakcji synaptycznych, które wpływają na pamięć i inne funkcje poznawcze (także przez pobudzenie receptorów NMDA) [240,266]. W dotychczasowych badaniach egzogeny BDNF powodował regenerację aksonów szczurów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego czy chronił komórki zwojowe siatkówki [267,268]. Z drugiej strony może on też

przewodzą do apoptozy – w zależności od formy czynnika i receptora, przez który działa [240,262].

Komórka poddana stresowi aktywuje kilka ścieżek sygnałowych, w czym szczególnie ważną rolę modulującą zdaje się odgrywać jądrowy czynnik kappa-B (NF-kB), który bierze udział w odpowiedzi immunologicznej w kilku chorobach psychiatrycznych i neurodegeneracyjnych. W badaniach na zwierzętach, obserwowano różne rezultaty nadekspresji BDNF. W niektórych do nadmiernej odpowiedzi układu odpornościowego poprzez pobudzenie NF-kB i przez to do m.in. wyrzutu cytokin prozapalnych (zwł. TNF alfa, IL-1 beta) i nieprawidłowej aktywacji komórek glejowych mogącej aktywować szlaki proapoptotyczne [267]. Zablockowanie TrkB łagodziło stan zapalny [267]. W innych obserwowano zahamowanie aktywacji mikrogleju oraz zmniejszenie poziomu cytokin prozapalnych [269]. Co ciekawe, badania te nie dotyczyły chorób pierwotnie dotykających struktury nerwowe. [129,240,267,270]. Przyczyna występowania tak odmiennych wyników nie jest znana. Zhao et al. [271] wykazali, że myszy pozbawione genu *BDNF*, z wywołanym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych miały znacznie większe stężenie cytokin prozapalnych i uszkodzenie neuronów. W większości prac oceniających stężenia neurotrofin w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów narażonych na zakażenia wirusowe, stwierdzano podwyższony poziom BDNF w ostrej fazie choroby, co korelowało z gorszym stanem klinicznym i gorszym rokowaniem [272,273]. W aspekcie długoterminowym infekcja powodowała spadek BDNF, który mógł wiązać się z pogorszeniem funkcji poznawczych u chorych [274]. Taki związek udowodniono dla wirusów HIV-1 i HSV-1, i prawdopodobnie dla infekcji powodowanych przez EBV i wirusy układu oddechowego, takie jak RSV, wirus grypy czy SARS-CoV-2 [272].

Jedną z najczęstszych mutacji punktowych w genie *BDNF* upośledza proces translacji i wewnątrzkomórkowego transportu substancji oraz powoduje jej zwiększoną degradację. W konsekwencji dochodzi do redukcji ilości neuronów m.in. w hipokampie oraz zaburzeń funkcji poznawczych. Taką mutację wykrywano m.in. u pacjentów z AD i PD [275,276]. Ponadto polimorfizmy genu *BDNF*, zwłaszcza G196A i C270T, są związane z chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym ALS [277].

Wpływ *BDNF* na patofizjologię ALS jest prawdopodobnie wielomejskowy. Nie wiadomo, czy jego rola jest kluczowa dla rozwoju choroby. Fizjologicznie *BDNF* działając na synapsy wzmacnia wydzielanie glutaminianu i sygnalizację związaną z tym przekaźnikiem. Uważa się, że w początkowej fazie ALS synaptyczna nadpobudliwość motoneuronów wzmacnia taką sygnalizację, przez co uwalniane są większe ilości glutaminianu, co z kolei wzmacnia jego działanie toksyczne i wrażliwość komórek na uszkodzenie [278]. Myszy z usuniętym genem *BDNF* wykazały cechy zwiększonego stresu oksydacyjnego [279].

TrkB (podobnie jak inne receptory Trk), główny receptor *BDNF*, istnieje w trzech izoformach – jednej pełnej (TrkB.FL) i dwóch skróconych, z niedoborem kinazy tyrozynowej (TrkB.T1 i TrkB.T2). Domena kinazy obecna w TrkB.FL, a nieobecna w jego skróconych formach ma fundamentalne znaczenie dla inicjacji szlaków prowadzących do przeżycia komórki. Ponadto TrkB.T1 i T2 osłabiają działanie TrkB.FL. W ALS obserwuje się nieprawidłowości w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w której pośredniczy TrkB, zwiększoną ekspresję *p75* oraz wzrost ilości skróconych form receptorów TrkB, co powoduje mniejsze możliwości proneuronalnego, ochronnego działania *BDNF* [280]. Jednak zablokowanie TrkB.T1 w modelu zwierzęcym nie powoduje zablokowania stanu zapalnego rdzenia, ani nie ochrania motoneuronów przed śmiercią, choć we wczesnym stadium choroby zmniejsza utratę siły mięśniowej [281].

Jak wspomiano, BDNF może być wydzielany także przez mięśnie, co jest związane z możliwą inicjacją ALS. Martin i Wong [282] stworzyli model transgenicznych myszy, w których mutacja SOD1 była obecna tylko w mięśniach szkieletowych, co ostatecznie spowodowało w pełni rozwinięte objawy ALS. W ten sposób powstała tzw. teoria „oddolna”, w której motoneurony są szczególnie wrażliwe na degradację czynnikiem napływającym wstecznie od mięśni. BDNF wytwarzany na obwodzie odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu części presynaptycznej złącza nerwowo-mięśniowego, biorąc udział w generowaniu skurczu mięśnia [277]. Dodatkowo wykazano, że wyzwolone wysiłkiem fizycznym uwalnianie tego czynnika z mięśni, spowalnia postęp ALS u gryzoni [148]. Just-Borras et al. [283] nazwali ALS dystalną aksonopatią, w której dysfunkcja złącza nerwowo-mięśniowego poprzedza i wpływa na utratę motoneuronów.

1.3.3 Neurotrofina 3

W roku 1990 Maisonpierre et al. [284] badając homologię sekwencji DNA pomiędzy NGF, a BDNF odkryli nową substancję z grupy neurotrofin – NT-3.

NT-3, tak jak jej poprzedniczki, cechuje słabe powinowactwo do receptora p75, a także receptora Trk typu A oraz B, natomiast silnie wiąże się z receptorem TrkC [285]. Większa ilość potencjalnych miejsc wiązania czyni ją wyjątkową w rodzinie neurotrofin, z uwagi na możliwość wpływu na większą liczbę komórek. Oddziaływanie na neurony jest tu również zależne od aktywowanego receptora i ścieżki sygnałowej, ale ogólnie przyjmuje się, że NT-3 wpływa korzystnie na plastyczność synaps, transmisję synaptyczną oraz regenerację, wzrost i przeżycie komórek nerwowych. Myszy sztucznie pozbawione NT-3 wykazywały znaczne deficyty w zakresie ilości czuciowych neuronów współczulnych i proprioceptywnych, mechanoreceptorów oraz komórek glejowych.

Obserwowano także związek z nasilaniem zaburzeń ruchowych i zaburzenia zachowań wyuczonych [286]. Ilość TrkC na błonie synaptycznej wydaje się być w normalnych warunkach regulowana głównie przez stężenie NT-3 [287]. Patologiczna aktywacja, czy liczba receptorów TrkC powoduje nieprawidłowości, głównie w postaci zaburzonej transmisji synaptycznej między neuronami, zaburzonej synaptogenezy, czy zmniejszonej ilości pęcherzyków wydzielniczych, nawet przy prawidłowym TrkA i TrkB [286]. Szczególnie ważną rolę NT-3 odgrywa przy neurogenezie w trakcie tworzenia motoneuronów rdzenia kręgowego, gdzie jej ekspresja jest bardzo wysoka [288]. Z wiekiem ilość NT-3 spada. W dorosłym mózgu jest jej najwięcej w neuronach i komórkach glejowych zakrętu zębatego hipokampu, ale występuje również w korze mózgowej, ciele modzelowatym, prążkowi, mózdzku, istocie czarnej czy motoneuronach obwodowych [286].

Co istotne, NT-3 ma swój udział w stanie zapalnym. Zewnętrzne podawanie interferonu beta [IFN- β] imitujące stan zapalny w badaniu Dedoni et al. [289] powodowało zwiększenie ilości skróconej, nieprawidłowej formy TrkC (TrkC.T1), co hamowało aktywność pełnej długości TrkC, a co za tym idzie również aktywność NT-3. W ostrej fazie bakteryjnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych obserwowano wzrost stężenia NT-3. Korelacja taka nie była obecna w zapaleniach o etiologii wirusowej [290,291].

Badania oceniające stężenia NT-3 w warunkach patologicznych u ludzi są nieliczne. W jednym z nich zaburzone funkcje wykonawcze u chorych w początkowej fazie AD powiązано z polimorfizmem genu *NT-3* (rs6332) [292], w innym obniżone stężenie NT-3 zaobserwowano u pacjentów z deficytami poznawczymi wywołanymi przez nadużywanie alkoholu [293]. Stwierdzano także, że poziom NT-3 jest zwiększony we krwi chorych z depresją, a zmniejszony w schizofrenii [294,295]. Podwyższone

stężenia NT-3, przy prawidłowych poziomach BDNF opisano u chorych z bólami neuropatycznymi [296] oraz u pacjentek doświadczających symptomów uszkodzenia obwodowego układu nerwowego, a leczonych z powodu raka piersi [297]. Spadek stężenia BDNF i NT-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano w długoterminowym zakażenia HIV, co korelowało z pogarszającym się stanem neurologicznym tych chorych [272,298].

Punktem łączącym NT-3 z ALS może być białko FUS. Okazuje się, że wiąże się ono z mRNA TrkC i odgrywa rolę w regulacji ekspresji izoform tego receptora w zależności od tkanki, w której się on się znajduje. W pracy Zou et al. [299] usunięcie FUS powodowało zwiększenie proliferacji neuronów korowych, ale z drugiej strony upośledzenie neuronów rdzeniowych (różniły się one stosunkiem izoform TrkC). W kolejnej fazie eksperymentu zmniejszona ilość TrkC spowodowała prawidłowy rozwój zarówno neuronów mózgu, jak i rdzenia kręgowego, co może sugerować rolę NT-3 w patogenezie ALS.

1.3.4 Czynniki martwicy nowotworów alfa (*ang. tumor necrosis factor alpha, TNF-alfa*) i receptor czynnika martwicy nowotworów (*ang. TNF receptor, TNFR*)

TNF-alfa, inaczej zwany kachektyną lub po prostu TNF. Jest to związek należący do funkcjonalnej rodziny cytokin prozapalnych i adipokin (adipocytokin) oraz strukturalnej rodziny białek przezbłonowych z tzw. nadrodziny TNF [300]. Choć pierwsze wzmianki o istnieniu substancji wpływającej na guzy nowotworowe pochodzą jeszcze z XIX. wieku, to białko nazwane TNF udało się zademonstrować dopiero w 1975r., kiedy zaobserwowano zmniejszanie się wymiarów niektórych typów nowotworów w odpowiedzi na infekcję bakteryjną organizmu myszy [301].

Działanie TNF α jest zależne od jego wpływu na dwa rodzaje receptorów, typu 1 (TNFR-1) oraz typu 2 (TNFR-2). TNFR-1 jest obecny na wszystkich rodzajach komórek, TNFR-2 możemy natomiast odnaleźć na komórkach immunologicznych (mieloidalnych oraz subpopulacjach limfocytów T i B – zwłaszcza regulatorowych T), komórkach śródbłonna, kardiomiocytach, ale także na neuronach. Receptory te działają poprzez różne ścieżki sygnałowe, R1 głównie prozapalne i proapoptyczne, R2 raczej anty-zapalne, ale także mogące prowadzić w stronę śmierci komórki. [302-304]. Wiązanie TNF α poprzez receptor R1 aktywuje kaskadę wielu innych protein, np. czynników transkrypcyjnych (m.in. NF-kB), powodując np. produkcję NO czy reaktywnych form tlenu, regulując aktywność kanałów jonowych i docelowo kierując komórkę, w OUN zwł. komórkę glejową, w stronę śmierci poprzez apoptozę lub nekrotozę. Poprzez indukcję wydzielania GDNF może natomiast działać ochronnie na neurony. TNFR-2 nie ma stricte tzw. domeny śmierci, choć również może powodować degradację neuronów, ale jego pobudzenie często promuje ścieżki utrzymujące homeostazę w komórkach glejowych, w tym proliferację, przeżycie i regenerację, a także regulację odpowiedzi zapalnych. Dodatkowo, R2 wykazuje rolę ochronną w autoimmunologii poprzez wzmacnianie aktywności regulatorowych limfocytów T [300,302,305]. Wykazano, że stężenia krążących TNFR-1 i TNFR-2 zwiększają się wraz z aktywnością TNF- α w odpowiedzi na bodźce prozapalne. Są one użytecznymi markerami aktywności TNF- α ze względu na ich długi okres półtrwania w osoczu [306].

Główną funkcją TNF α wydaje się regulacja układu immunologicznego. Białko produkowane jest zarówno przez komórki związane z odpornością wrodzoną, takie jak makrofagi czy komórki NK, jak i nabytą, takie jak aktywowane limfocyty T. TNF α jest kluczowy w przebiegu sepsy. Substancja wywołuje podwyższenie temperatury ciała, stan

zapalny i kacheksję, a hamuje nowotworzenie oraz replikację wirusów. Działa we współpracy z innymi cytokinami [300,302].

Z uwagi na bogactwo aktywowanych przez siebie ścieżek sygnałowych w OUN rola TNF α może być dwojaka. System immunologiczny OUN może być traktowany jako specyficzny i odrębny. W sytuacji uszkodzenia układu nerwowego nadmiernie aktywowany (również przez TNF α) mikroglej wydziela duże ilości substancji prowadzących do apoptozy nieprawidłowych neuronów. Z drugiej strony sam TNF α wykazuje też działanie ochronne dla komórek nerwowych poprzez: stymulację ich plastyczności (poprzez działanie na rec. AMPA i NMDA) i mielinizacji [127,302], pobudzenie wydzielania czynników antyapoptycznych, buforowanie wewnątrzkomórkowej ilości wapnia, ale też, co ważne dla tej pracy – stymulację uwalniania neurotrofin [307]. Istotnym wydaje się fakt, że uruchamiane ścieżki sygnałowe są zależne nie tylko od pobudzonego receptora, ale także od miejsca w mózgowiu. Z badania Rodriguez et al. [308] wynika, że brak receptorów TNF działa ochronnie w neuronach prążkowiec, ale wywiera odwrotne, szkodliwe działanie w neuronach hipokampu. Regeneracja uszkodzeń w prążkowiec okazuje się być zależna specyficznie od TNFR-1, natomiast regeneracja w hipokampie – od TNFR-2, mimo, że ilość obu receptorów znajdujących się w tych rejonach jest jednakowa. Wydaje się więc, że podział receptorów TNF nie jest tak prosty, jak się wcześniej wydawało. Ponadto, zwiększone stężenia TNF α , produkowanego w warunkach zapalnych przez mikroglej i same neurony, mogą powodować ekscytotoksyczność, wzmacniać zapalenie układu nerwowego oraz przełamanie bariery krew-mózg (poprzez wpływ na molekuly adhezyjne przez TNFR-1) [127,302]. Działanie TNF α wiąże się także z wydzielaniem i działaniem neurotrofin. Wspomniany wcześniej receptor neurotrofin p75 należy do nadrodziny TNF α .

i zawiera domenę śmierci. Także TrkC, czyli receptor NT-3, aktywowany nie w pełnej, ale w swojej skróconej formie (TrkC.T1) produkuje TNF α [309].

W modelu zwierzęcym [310] neutralizacja TNF- α redukuje późniejsze uszkodzenie neuronów w odpowiedzi na niedokrwienie mózgu, promuje też szybszą regenerację. W innym badaniu [311] wcześniejsze narażenie na TNF- α chroniło komórki nerwowe przed uszkodzeniem związanym z beta-amyloidem. Także w zakresie mielinizacji sytuacja jest niejasna. Nadekspresja TNF- α w OUN myszy powoduje spontaniczną demielinizację [312], a w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z MS stężenia TNF- α są podwyższone [313]. Jednakże, całkowity brak TNF- α u myszy również nie jest korzystny. Pogarsza on przebieg eksperymentalnego, autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia i nasila związaną z nim demielinizację [314]. W warunkach fizjologicznych, receptory TNF wykazują ekspresję w OUN głównie na komórkach nerwowych oraz śródbłonku naczyń, podczas gdy przy stanie zapalnym, czy innym rodzaju uszkodzenia - głównie na komórkach glejowych [315]. Ta właśnie ekspresja TNFR może więc decydować o losie komórki w danym momencie. Wg Chadwicka et al., ale też innych badaczy [307,316] TNF α działając na neurony promuje ich przeżycie, natomiast jego wpływ na mikroglej, czy makrofagi skutkuje rozpoczęciem łańcucha zdarzeń prowadzącego do neurotoksyczności i apoptozy. Umierające neurony generują TNF- α pobudzające ponownie mikroglej, co dodatkowo nakręca spiralę śmierci komórek.

Rola dysregulacji produkcji TNF- α podnoszona była w wielu jednostkach chorobowych, nie tylko typowo infekcyjnych, w tym w ALS. [317-319].

Związków TNF- α z ALS możemy doszukiwać się na kilku płaszczyznach. Po pierwsze, substancja ta oddziałuje z astrocytami, których zadaniem w warunkach fizjologicznych jest wychwyt nadmiernych ilości toksycznego glutaminianu z przestrzeni

zewnątrzkomórkowej. Pod wpływem wytwarzanego przez aktywowane limfocyty T $TNF-\alpha$ dochodzi do zmniejszenia tego wychwytu, co prowadzi do ekscytotoksyczności i uszkodzenia neuronów oraz oligodendrocytów [320]. Poza tym, w rdzeniu kręgowym zarówno ALS (+) myszy, jak i pacjentów z ALS stosunek izoform TrkC zmienia się ze zwiększeniem produkcji $TNF-\alpha$, co powoduje zmniejszenie ochronnego wpływu NT-3 na neurony oraz promuje neurotoksyczność [309]. Wydzielanie $TNF-\alpha$ jest w znacznej mierze indukowane przez pochodzącą spoza OUN cytokinę – interferon gamma ($IFN-\gamma$), co sugeruje, że przez barierę krew-mózg mogą przechodzić aktywowane limfocyty T. W badaniach pośmiertnych pacjentów z ALS znaleziono ślady infiltracji limfocytów i depozyty przeciwciał w OUN, w ilości dodatnio korelującej z czasem trwania choroby [127,321]. Mogłoby to sugerować systemową etiologię zapalenia w ALS. Ponadto, $TNF-\alpha$ oraz $IFN-\gamma$ są udowodnionymi induktorami stresu oksydacyjnego [322]. $TNF-\alpha$ ma wpływ na gen *SOD1* poprzez zmniejszanie jego ekspresji, a także poziomu i aktywności białka SOD1 [128,323]. Obfitą sekrecję $TNF-\alpha$ prowadzącą do śmierci motoneuronów obserwowano również w astrocytach chorych z mutacją *FUS* [324]. Udowodniono, że iniekcja przeciwciał neutralizujących tę cytokinę chroniła neurony [325]. Wreszcie, wytwarzany przez pobudzony zapalnie mikroglej $TNF-\alpha$ zmienia podtyp astrocytów na A1, który przestaje promować przeżycie otaczających neuronów, a zaczyna indukować ich degenerację. Tego typu astrocyty są obficie reprezentowane w OUN chorych na ALS [326].

Warto także wspomnieć, że edaravone, jeden z niewielu leków dopuszczonych w ALS, poza działaniem antyoksydacyjnym, łagodzi także pobudzenie zapalne astrocytów i zmniejsza ekspresję $TNF-\alpha$ [327].

2 CEL PRACY

Celem pracy była odpowiedź na pytania:

- 1) czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem markerów zapalnych krwi obwodowej (leukocytów i poszczególnych frakcji, fibrynogenu i białka C-reaktywnego) a stężeniem wybranych neurotrofin płynu mózgowo-rdzeniowego (frakcji beta czynnika wzrostu nerwów, neurotroficznym czynnikiem pochodzenia mózgowego, neurotrofiną 3, czynnikiem martwicy nowotworów, receptorem czynnika martwicy nowotworów typu 1) i stężeniem białka C-reaktywnego płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów ze sporadyczną postacią stwardnienia zanikowego bocznego?
- 2) czy istnieje związek pomiędzy stężeniem badanych markerów zapalnych krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego oraz wybranych neurotrofin a obrazem klinicznym choroby?

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 GRUPA BADANA

Do badania włączono 45. pacjentów (21. kobiet i 24. mężczyzn) z pewnym lub prawdopodobnym rozpoznaniem sALS, postawionym na podstawie zmodyfikowanych kryteriów El Escorial [35], będących uczestnikami badania klinicznego numer NCT02193893 prowadzonego w Katedrze i Klinice Neurologii PUM w Szczecinie w latach 2018-2019 (Kierownik Kliniki – prof. dr hab. n. med. Przemysław Nowacki).

Od wszystkich pacjentów zebrano wywiad posługując się autorskim formularzem, który zawierał dane dotyczące: wieku, płci, wieku zachorowania, czasu trwania choroby i postaci choroby.

Każdorazowo przeprowadzono badanie neurologiczne i internistyczne.

Chorych oceniano:

- **zmodyfikowaną Skalą Norrisa [328],**

Zmodyfikowana skala Norrisa to kwestionariusz mający na celu ocenę stopnia nasilenia choroby, składający się z 40. elementów zawierających ocenę: stanu neurologicznego pacjenta (m.in. oddychanie, połykanie, zaburzenia mowy, niedowłady kończyn), sprawności ruchowej (m.in. wstawanie z łóżka, chodzenie, chodzenie po schodach) oraz zdolności samodzielnego wykonywania czynności dnia codziennego (m.in. mycie, ubieranie się, jedzenie, picie). Każdy z tych elementów jest oceniany osobno, od 0 do 3 punktów (3 punkty -wynik prawidłowy). W skali pacjent może uzyskać od 0 do 120 punktów, gdzie większa liczba punktów oznacza mniejsze nasilenie choroby.

Ze względu na łatwość przeprowadzenia oceny stanu chorego, skala Norrisa jest powszechnie stosowana w praktyce lekarskiej, jak również w próbach klinicznych.

- Skorygowaną Funkcjonalną Skalą Stwardnienia Zanikowego Boczno (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-Revised, ALSFRS-R*) [12],

Skala ALSFRS-R jest metodą obiektywnej oceny poziomu funkcjonowania chorych, składającą się z 12. pytań dotyczących różnych aspektów życia upośledzanych przez schorzenie (zaburzenia opuszkowe, oddechowe, sprawność kończyn, poruszanie się). Łącznie pacjent może uzyskać od 0 do 48 punktów, gdzie większa liczba punktów oznacza lepsze funkcjonowanie chorego.

ALSFRS-R jest od wielu lat chętnie stosowana zarówno w praktyce, jak i badaniach klinicznych. Została wielokrotnie poddana walidacji.

- Skalą ALSAQ-40 (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Assessment Questionnaire -40, ALSAQ-40*) [329].

Kwestionariusz ALSAQ-40 jest narzędziem do pomiaru zależnej od stanu zdrowia jakości życia. Skala składa się z 40 pytań, dotyczących pięciu aspektów funkcjonowania (ograniczeń wynikających z pogorszenia aktywności fizycznej, ograniczeń codziennych czynności/utruty niezależności, zaburzeń komunikacji werbalnej, zaburzeń funkcjonowania emocjonalnego oraz dysfunkcji podczas jedzenia i picia). Pacjenci wybierają odpowiedź spośród opcji: nigdy / rzadko / czasami / często / zawsze lub w ogóle nie mogę tego zrobić. W każdej z ocenianych domen chory może uzyskać od 0 do 100 punktów, gdzie większa liczba oznacza gorszą QoL (Tabela 2).

Zastosowany kwestionariusz był wielokrotnie walidowany pod kątem wiarygodności i wrażliwości na zmiany.

Tabela 2. Interpretacja zakresów punktacji dla wymiarów w ALSAQ-40.

Zakres punktów	Interpretacja
0-19	bez problemów
20-39	problemy rzadko
40-59	problemy czasami
60-79	problemy często
80-100	problemy zawsze/prawie zawsze lub nie jest w stanie wykonać

Za: Gołąb-Janowska M., Honczarenko K., Stankiewicz J. Usefulness of the ALSAQ-5 scale in evaluation of quality of life in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neurochir Pol.* 2010;44(6):560-6. doi: 10.1016/s0028-3843(14)60153-5. [330]. Zmodyfikowano.

Kryteriami wyłączającymi z badania było:

- wiek poniżej 18 i powyżej 65 lat
- brak możliwości wyrażenia świadomej zgody na udział w badaniu i cechy otępienia
- obecność schorzeń współistniejących mogących wpływać na parametry poddane ocenie w niniejszej pracy (m.in. nowotworów, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłej choroby nerek lub wątroby, niewyrównanej choroby tarczycy, chorób autoimmunologicznych)
- przyjmowanie leków wpływających na funkcję szpiku kostnego.

3.2 GRUPA KONTROLNA

Grupę kontrolną stanowiło 30 osób (17. kobiet i 13. mężczyzn) zgłaszających się z powodu bólu głowy do Izby Przyjęć Neurologicznej w obrębie Szpitalnego Oddziału Ratunkowego Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 1 w Szczecinie,

którym w ramach standardowej diagnostyki pobierano płyn mózgowo-rdzeniowy.

U każdej osoby z grupy kontrolnej zebrano wywiad, przeprowadzono pełne badanie neurologiczne oraz internistyczne.

Kryteriami wyłączającymi było:

- nieprawidłowy wynik badania ogólnego płynu mózgowo-rdzeniowego
- wiek poniżej 18 i powyżej 65 lat
- brak możliwości wyrażenia świadomej zgody na udział w badaniu, cechy otępienia
- obecność przewlekłych chorób neurologicznych
- obecność schorzeń współistniejących mogących wpływać na parametry poddane ocenie w niniejszej pracy (m.in. nowotworów, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłej choroby nerek lub wątroby, niewyrównanej choroby tarczycy, chorób autoimmunologicznych)
- przyjmowanie leków wpływających na funkcję szpiku kostnego.

Badanie zostało pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (nr uchwały KB-0012/06/10/A-1 podjęta dn. 25.01.2010r. z następową zgodą na zmiany dn. 27.01.2020r.) i wykonane zgodnie z Deklaracją Helsińską. Wszyscy uczestnicy podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu.

3.3 BADANIA KRWI

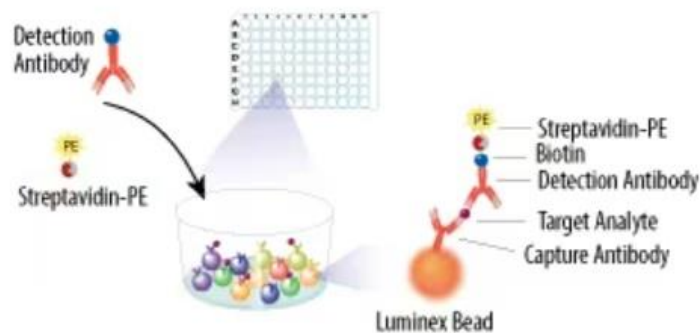
Badania laboratoryjne z krwi obwodowej (morfologia krwi pełna, CRP i fibrynogen) wykonano w Laboratorium Diagnostyki SPSK Nr 1 w Szczecinie, według standardów laboratorium, w dniu pobrania próbki.

3.4 BADANIA PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

Próbki płynu mózgowo-rdzeniowego zarówno od grupy badanej, jak i kontrolnej zostały pobrane drogą punkcji lędźwiowej. W dniu pobrania materiał przewożono do Zakładu Patologii Ogólnej PUM w Szczecinie (Kierownik Zakładu - prof. dr hab. n. med. Bogusław Machaliński), gdzie był on odwirowywany w wirówce Eppendorf z prędkością 2 tys. obrotów/min przez 10 minut. Nadsącz płynu następnie przechowywany w temperaturze -80 st. C. do czasu wykonania oznaczeń.

Po zebraniu materiału od grupy badanej i kontrolnej (75. próbek) materiał rozmrożono w temperaturze pokojowej i wykonano test immunologiczny z użyciem fluorymetru przepływowego Luminex (Luminex Corporation, USA). W metodzie tej wykorzystano przygotowany przez producenta zestaw fluorescencyjnych mikrokulek opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku C-reaktywnemu oraz BETA-NGF, BDNF, NT-3, TNF-ALFA oraz TNFR-1, które inkubowano z badanymi próbkami płynu mózgowo-rdzeniowego. Po dodaniu izolatu specyficznych, biotynylowanych przeciwciał detekcyjnych oraz barwnika reporterowego (streptawidyna-fikoerytyna) płytki z odczynnikami zostały poddane analizie we fluorymetrze Luminex (Rycina 2), gdzie odczytano piki fluorescencji dla każdej z próbek. Stężenia analitów określono w oparciu o krzywe standardowe przedstawiające średnie intensywności fluorescencji (*ang. Mean Fluorescence Intensity, MFI*) w stosunku do stężenia białka - intensywność fluorescencji użytego barwnika reporterowego pozostaje proporcjonalna do ilości badanego odczynnika związanego na powierzchni mikrokulki.

Badania zostały wykonane zgodnie z protokołem producenta.



Rycina 2. Zasada przygotowania analitu do fluorymetru Luminex

Detection Antibody – przeciwciało detekcyjne, Streptavidin-PE – streptawidyna-fikoerytyna, Biotin – biotyna, Target Analyte – szukany odczynnik, Capture Antibody – przeciwciało wychwytyjące, Luminex Bead – mikrokulka Luminex
Za: R&D Systems. *Luminex Assay Principle [online]* [331].

3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA

Dane zostały przedstawione jako wartości średnie z odchyleniami standardowymi dla zmiennych ciągłych i wartości procentowe dla zmiennych kategoriowych. Do oceny rozkładu normalnego badanych zmiennych ilościowych użyto testu Shapiro-Wilka, a analizie poddano ich średnie wartości wraz z odchyleniem standardowym. Rozkład zmiennych jakościowych zaprezentowano za pomocą analizy częstości z uwzględnieniem wartości procentowych. Wskaźnik NLR obliczano przez podział bezwzględnej liczby neutrofilów przez bezwzględną liczbę limfocytów.

Celem oceny statystycznej zależności między zebranymi danymi opisowymi, uzyskanymi wynikami z krwi oraz płynu mózgowo-rdzeniowego pacjenci z grupy badanej i osoby z grupy kontrolnej byli dodatkowo dzieleni na podgrupy. Podziału dokonywano dla każdego parametru z osobna, według jego wartości liczbowych – jeśli były poniżej mediany pacjenta przydzielano do podgrup A, jeśli powyżej do podgrup B.

W przypadku samej mediany decyzji dokonywano w zależności od liczebności zbiorów tak by były one jak najbardziej podobne liczbowo.

Różnice pomiędzy grupami badaną i kontrolną, a następnie między podgrupami dla każdego parametru oceniono za pomocą testu dla dwóch prób niezależnych U Manna-Whitneya. Następnie za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana analizowano związki danego parametru krwi z parametrem płynu mózgowo-rdzeniowego oraz następnie parametrów opisowych z danymi laboratoryjnymi.

Za istotne statystycznie uznano wartości p mniejsze lub równe 0,05. Wszystkie analizy statystyczne wykonano w programie STATISTICA 13.3.

4. WYNIKI

4.1 CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA I DEMOGRAFICZNA GRUP

Grupa badana składała się z 45 chorych, w tym 21 (46,6%) kobiet i 24 (53,4%) mężczyzn; w wieku od 27 do 65 lat, średnio $53,8 \pm 9,5$ lat. Grupę kontrolną stanowiło 30 osób, w tym 17 (56,6%) kobiet i 13 (43,4%) mężczyzn, w wieku od 23 do 78 lat, średnio $47,3 \pm 12,8$ lat (Tabele 3 i 4). Badane grupy nie różniły istotnie statystycznie się pod względem płci ($p=0,396$). Stwierdzono istotną statystycznie różnicę wieku w badanych grupach ($p=0,014$).

Tabela 3. Liczba kobiet i mężczyzn w badanych grupach.

	Grupa badana	Grupa kontrolna	Razem
Kobiety - n (%)	21 (46,6)	17 (56,6)	38
Mężczyźni - n (%)	24 (53,4)	13 (43,4)	37
Razem - n	45	30	75

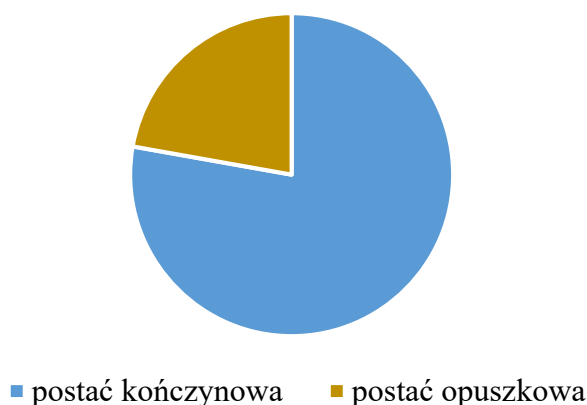
$p=0,396$

Tabela 4. Porównanie wieku w badanych grupach.

	Grupa badana	Grupa kontrolna
Wiek - lata	27-65	23-78
Średni wiek – lata	53,8	47,3
(odchylenie standardowe)	(9,5)	(12,8)

$p=0,014$

Czas trwania choroby wynosił od 5 miesięcy do 10 lat, średnio $29,6 \pm 26$ miesięcy. Dominowali pacjenci z postacią kończynową - 35 (77,8%) chorych; postać opuszkowa występowała u 10 (22,2%) chorych; u żadnego chorego nie stwierdzono postaci oddechowej, tzw. „*respiratory-onset*”. Graficzny rozkład klinicznych postaci ALS przedstawia Rycina 3.

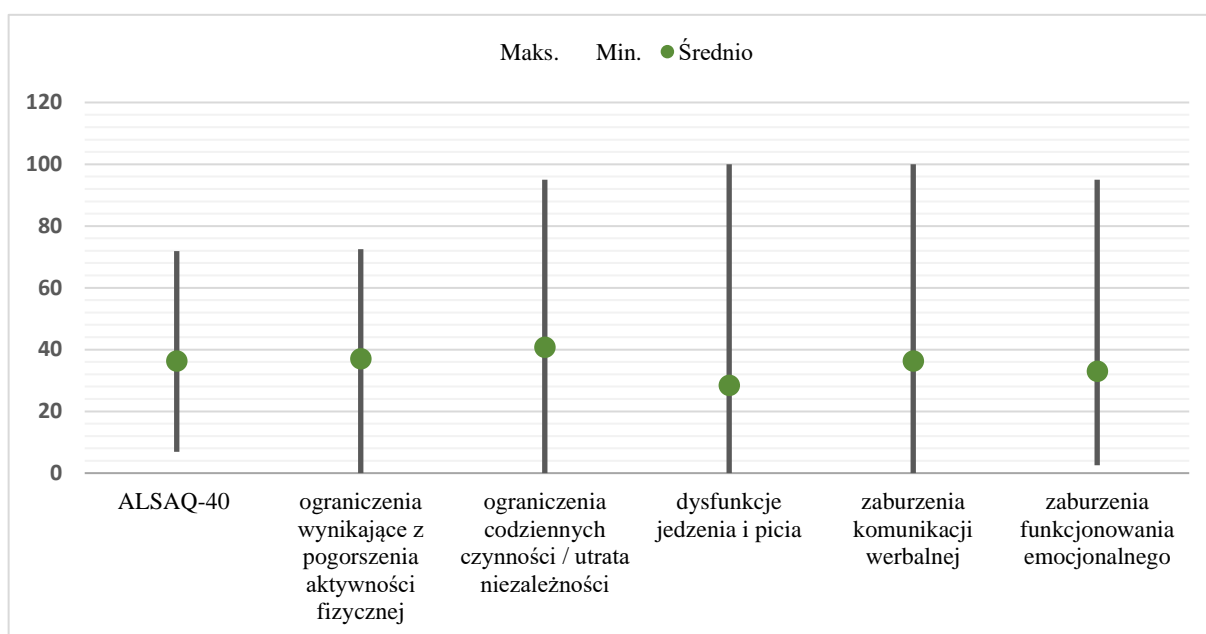


Rycina 3. Graficzny rozkład postaci ALS w grupie badanej.

W skali Norrisa pacjenci uzyskali od 55 do 113 pkt, średnio $85,6 \pm 15,6$ pkt. W skali ALFRS-R od 19 do 39 pkt, średnio $29,2 \pm 4,9$ pkt. Statystyczny pacjent grupy badanej, oceniony poprzez użyte przez nas testy, wykazuje więc pogorszenie sprawności codziennego funkcjonowania w stopniu umiarkowanym oraz ponad umiarkowane nasilenie choroby. Zastosowane skale okazały się powtarzalne – najwyższy i najniższy wynik w obu dotyczył tych samych chorych.

W skali ALSAQ-40 pacjenci uzyskali od 6,9 do 71,9 pkt., średnio $36,3 \pm 16,1$ pkt. Średnie wyniki QoL, ocenione ww. skalą, okazały się wyższe niż umiarkowane (lepsza QoL). Graficzny rozkład wyników przedstawiono na Rycinie 4. QoL okazała się być zaburzona głównie poprzez ograniczenia codziennych czynności/utrata niezależności (ALSAQ-40: 0-95 pkt., średnio $40,8 \pm 28,7$ pkt.), ograniczenia wynikające z pogorszenia

aktywności fizycznej (ALSAQ-40: 0-72,5 pkt., średnio $37,1 \pm 21,6$ pkt.), zaburzenia komunikacji werbalnej (ALSAQ-40: 0-100 pkt., średnio $36,3 \pm 36,7$ pkt.) i funkcjonowania emocjonalnego (ALSAQ-40: 2,5-95 pkt. 5–100, średnio $33 \pm 25,1$ pkt). Dysfunkcje jedzenia i picia (ALSAQ-40: 0–100 pkt., średnio $28,5 \pm 31$ pkt.) w mniejszym stopniu wpływały na QoL.



Rycina 4. Graficzny rozkład wyników w skali ALSAQ-40.

4.2 CHARAKTERYSTYKA LABORATORYJNA GRUP

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych z krwi w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w Tabeli 5.

Średnia całkowita liczba leukocytów w obu grupach mieściła się w zakresie normy, była jednak wyższa w grupie kontrolnej ($7,59 \pm 1,83$ tys./ul) niż badanej ($6,81 \pm 1,8$ tys./ul). Różnica ta była istotna statystycznie ($p=0,045$). Podobnie, liczba neutrofilów oraz limfocytów mieściła się w zakresie normy i była wyższa w grupie kontrolnej. Tu jednak różnice pomiędzy grupami okazały się nieistotne statystycznie. Procentowy udział

tych krwinek w całkowitej liczbie leukocytów okazał się bardzo podobny w obu grupach; dla neutrofilów było to 62,56% w grupie badanej vs. 63,11% w kontrolnej; dla limfocytów 27,61% w grupie badanej vs. 26,88% w kontrolnej. Także przeliczony NLR dla obu grup nie różnił się statystycznie.

Średnie stężenie CRP w obu grupach było podobne i nie różniło się statystycznie.

Stwierdzono znacząco wyższe stężenie fibrynogenu w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej ($340,42 \pm 78,69$ mg/dl vs. $296,62 \pm 56,72$ mg/dl; $p=0,011$).

Tabela 5. Porównanie wyników uzyskanych z krwi w grupie badanej i kontrolnej.

Parametr (jednostka)	Grupa badana (przedział; średnia \pm odchylenie standardowe)	Grupa kontrolna (przedział; średnia \pm odchylenie standardowe)	Istotność statystyczna (p)
leukocyty (tys./ul)	4,27-11,09; 6,81 \pm 1,8	3,3-10,35; 7,59 \pm 1,83	0,045
neutrofile (tys./ul)	2,17-7,76; 4,26 \pm 1,4	2,65-7; 4,79 \pm 1,37	0,127
limfocyty (tys./ul)	0,84-3,51; 1,88 \pm 0,63	0,92-3,36; 2,04 \pm 0,7	0,343
NLR	0,98-6,81; 2,5 \pm 1,25	1,28-5,94; 2,59 \pm 1,14	0,547
CRP (mg/l)	0,1-12,23; 1,66 \pm 2,66	0,1-8,06; 1,6 \pm 2,11	0,565
fibrynogen (mg/dl)	146,3-522,3; 340,42 \pm 78,69	207,1-414; 296,62 \pm 56,72	0,011

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych z płynu mózgowo-rdzeniowego w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w Tabeli 6.

Stężenia TNF-alfa w obu grupach było poniżej granicy oznaczalności (<2,77 pg/ml).

Również stężenie NGF-beta u większości badanych było poniżej granicy oznaczalności (<0,97 pg/ml). Wyniki uzyskano jedynie w przypadku jednego chorego z ALS oraz trzech osób z grupy kontrolnej.

Stężenia CRP w PMR okazały się wyższe w grupie badanej niż kontrolnej ($32.344,68 \pm 63.792,95$ vs. $17.222,85 \pm 34.585,48$), ale nie była to różnica istotna statystycznie.

Stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie BDNF w grupie badanej niż w grupie kontrolnej ($23,76 \pm 67,48$ pg/ml vs. $7,08 \pm 3,71$ pg/ml, $p=0,001$).

Stężenia NT-3 również były istotnie statystycznie wyższe w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej ($8,72 \pm 3,73$ pg/ml vs. $6,72 \pm 1,7$ pg/ml, $p=0,045$).

Także stężenia TNFR-1 okazały się wyższe w grupie badanej niż kontrolnej i była to różnica istotna statystycznie ($1029,52 \pm 175,97$ pg/ml vs. $846,1 \pm 167,51$ pg/ml, $p=0,000$).

Tabela 6. Porównanie wyników uzyskanych z płynu mózgowo-rdzeniowego w grupie badanej i kontrolnej.

Parametr (jednostka)	Grupa badana (przedział; średnia ± odchylenie standardowe)	Grupa kontrolna (przedział; średnia ± odchylenie standardowe)	Istotność statystyczna (p)
NGF-beta (pg/mL)	<0,97-0,99	<0,97-1,18	-
BDNF (pg/mL)	4,59-440,13; 23,76 ± 67,48	4,05-23,39; 7,08 ± 3,71	0,001
NT-3 (pg/mL)	3,15-15,97; 8,72 ± 3,73	3,77-11,12; 6,72 ± 1,7	0,045
CRP (pg/mL)	710,43-371.540; 32.344,68 ± 63.792,95	961,81-171.530; 17.222,85 ± 34.585,48	0,089
TNF-alfa (pg/mL)	<2,77	<2,77	-
TNF-receptor 1 (pg/mL)	597,52-1469,84; 1029,52 ± 175,97	578,74-1221; 846,1 ± 167,51	0,000

4.3 ZWIĄZEK POMIĘDZY PARAMETRAMI ZAPALNYMI KRWI OBWODOWEJ A WYBRANYMI NEUROTROFINAMI I STĘŻENIEM CRP W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM

W pierwszej kolejności dokonano porównania wartości parametrów PMR w zależności od niższych lub wyższych stężeń substancji badanych we krwi.

Analizie poddano:

1) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami całkowitej liczby krwinek białych we krwi w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic analizowanych parametrów.

2) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami liczby neutrofilów we krwi w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenia CRP w PMR w podgrupie z większą liczbą neutrofilów ($45.556,99 \text{ pg/mL} \pm 86.308,76$ vs. $16.629,1 \text{ pg/mL} \pm 25.319,89$, $p=0,048$).

3) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami liczby limfocytów we krwi w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR.

Stwierdzono istotnie wyższe stężenia CRP w PMR w podgrupie z większą liczbą limfocytów ($32.732,72 \text{ pg/mL} \pm 43.705,53$ vs. $31.956,64 \text{ pg/mL} \pm 80.139,75$, $p=0,032$).

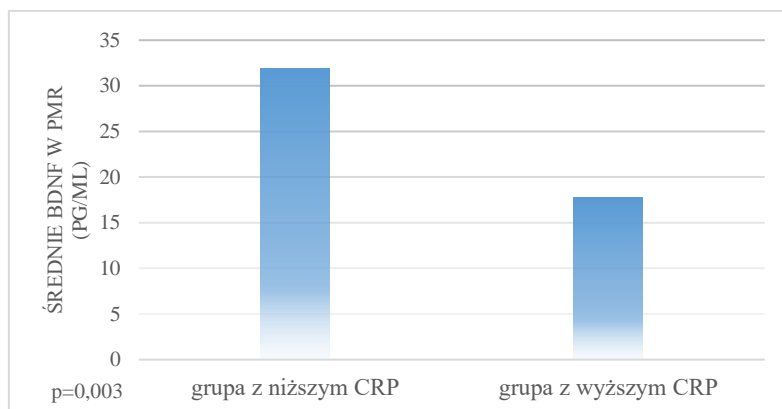
4) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami NLR w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

5) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami stężeń CRP w osoczu w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR.

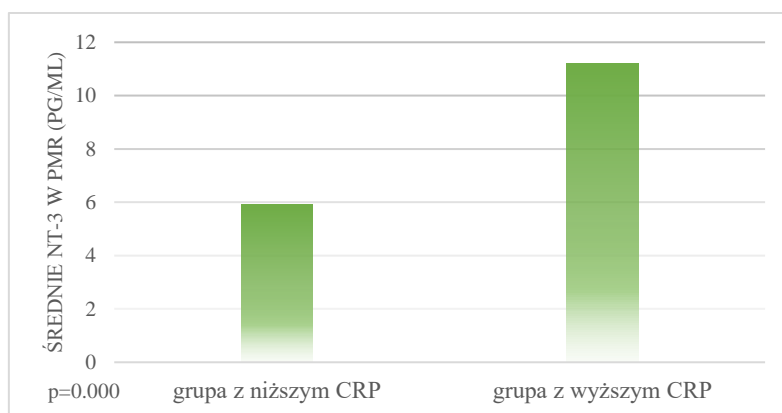
Stwierdzono:

- istotnie niższe wartości BDNF w PMR w podgrupie z większym stężeniem CRP w osoczu ($17,81 \text{ pg/mL} \pm 26,75$ vs. $31,9 \text{ pg/mL} \pm 96,83$, $p=0,003$); rycina 5,
- istotnie wyższe wartości NT-3 w PMR w podgrupie z większym stężeniem CRP w osoczu ($11,2 \text{ pg/mL} \pm 3,24$ vs. $5,91 \text{ pg/mL} \pm 2,01$, $p=0,000$); rycina 6,

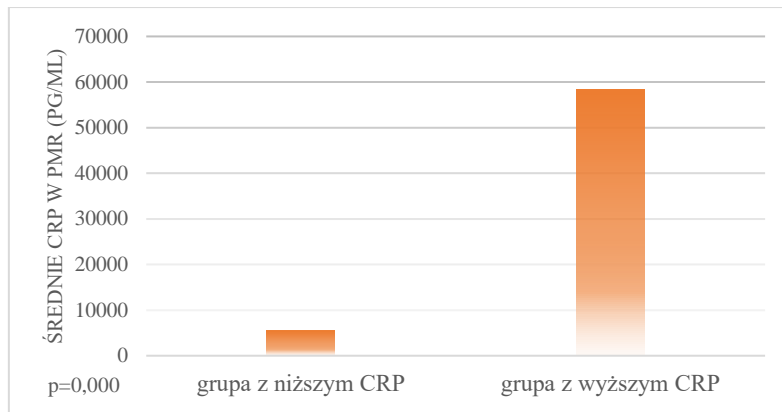
- istotnie wyższe wartości CRP w PMR w podgrupie z większym stężeniem CRP w osoczu ($58.320,38 \text{ pg/mL} \pm 82.964,73$ vs. $5.510,92 \text{ pg/mL} \pm 5.067,14$, $p=0,000$); rycina 7.



Rycina 5. Porównanie stężenia BDNF w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.



Rycina 6. Porównanie stężenia NT-3 w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.

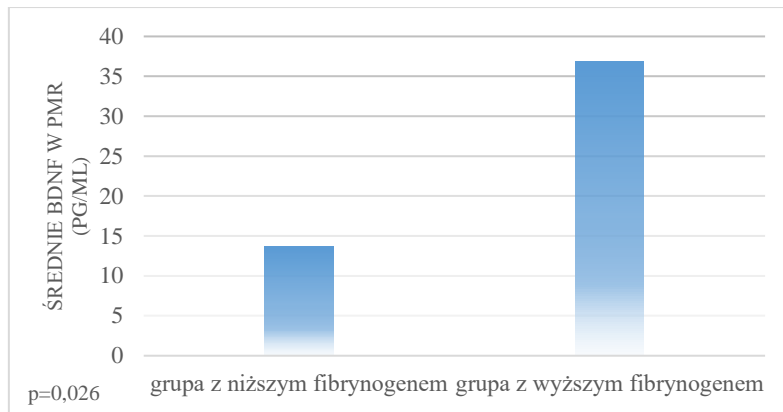


Rycina 7. Porównanie stężenia CRP w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.

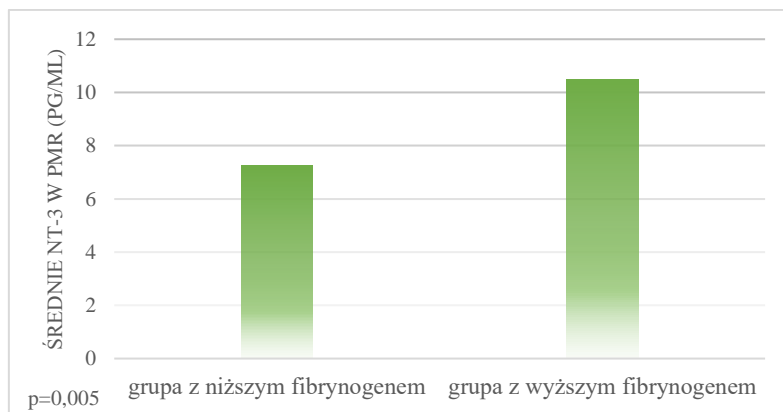
6) różnicę pomiędzy podgrupami z niższymi i wyższymi wartościami stężenia fibrynogenu w osoczu w zakresie stężeń BDNF, NT-3, CRP i TNFR-1 w PMR.

Stwierdzono:

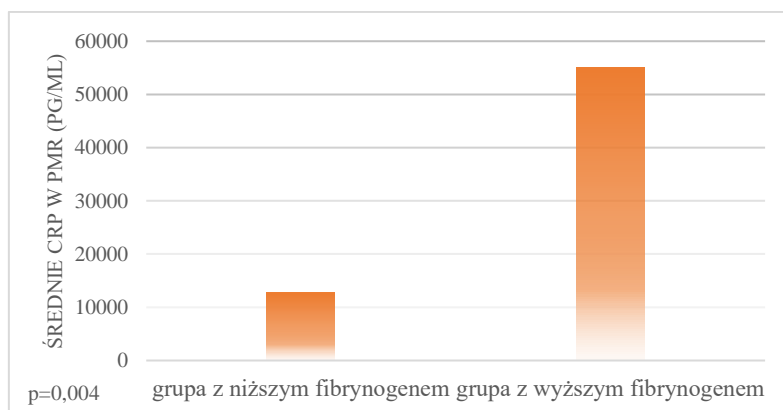
- istotnie wyższe wartości BDNF w PMR w podgrupie z większym stężeniem fibrynogenu w osoczu ($36,8 \text{ pg/mL} \pm 96,98$ vs. $13,69 \text{ pg/mL} \pm 23,18$, $p=0,026$); rycina 8,
- istotnie wyższe wartości NT-3 w PMR w podgrupie z większym stężeniem fibrynogenu w osoczu ($10,49 \text{ pg/mL} \pm 3,7$ vs. $7,25 \text{ pg/mL} \pm 2,96$, $p=0,005$); rycina 9,
- istotnie wyższe wartości CRP w PMR w podgrupie z większym stężeniem fibrynogenu w osoczu ($55.125,12 \text{ pg/mL} \pm 87.808,85$ vs. $12.703,01 \text{ pg/mL} \pm 19.897,82$, $p=0,004$); rycina 10.



Rycina 8. Porównanie stężenia BDNF w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogeny w osoczu.



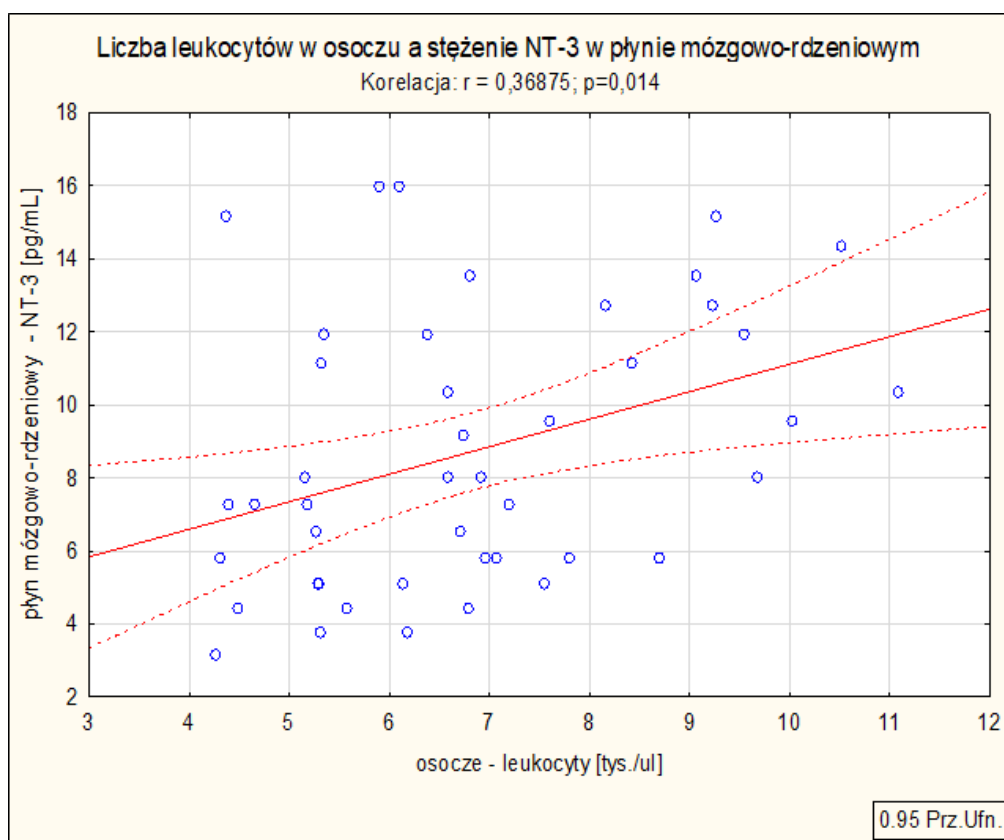
Rycina 9. Porównanie stężenia NT-3 w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogeny w osoczu.



Rycina 10. Porównanie stężenia CRP w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogeny w osoczu.

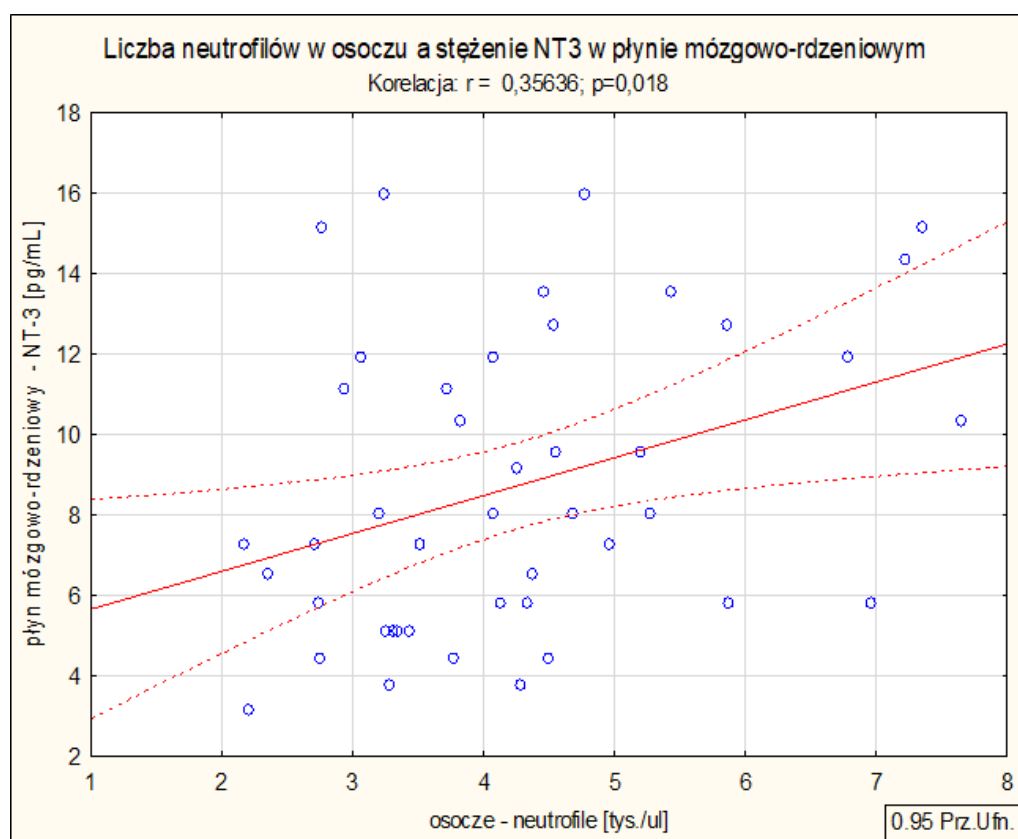
W celu ustalenia ewentualnych korelacji między porównywanymi wcześniej wartościami oceniono:

1) związek pomiędzy całkowitą liczbą krwinek białych we krwi i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Stwierdzono istotną statystycznie, przeciętną, dodatnią korelację ze stężeniem NT-3 w grupie badanej ($R=0,37$ przy $p=0,0140$); rycina 11.



Rycina 11. Korelacja pomiędzy liczbą leukocytów we krwi a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

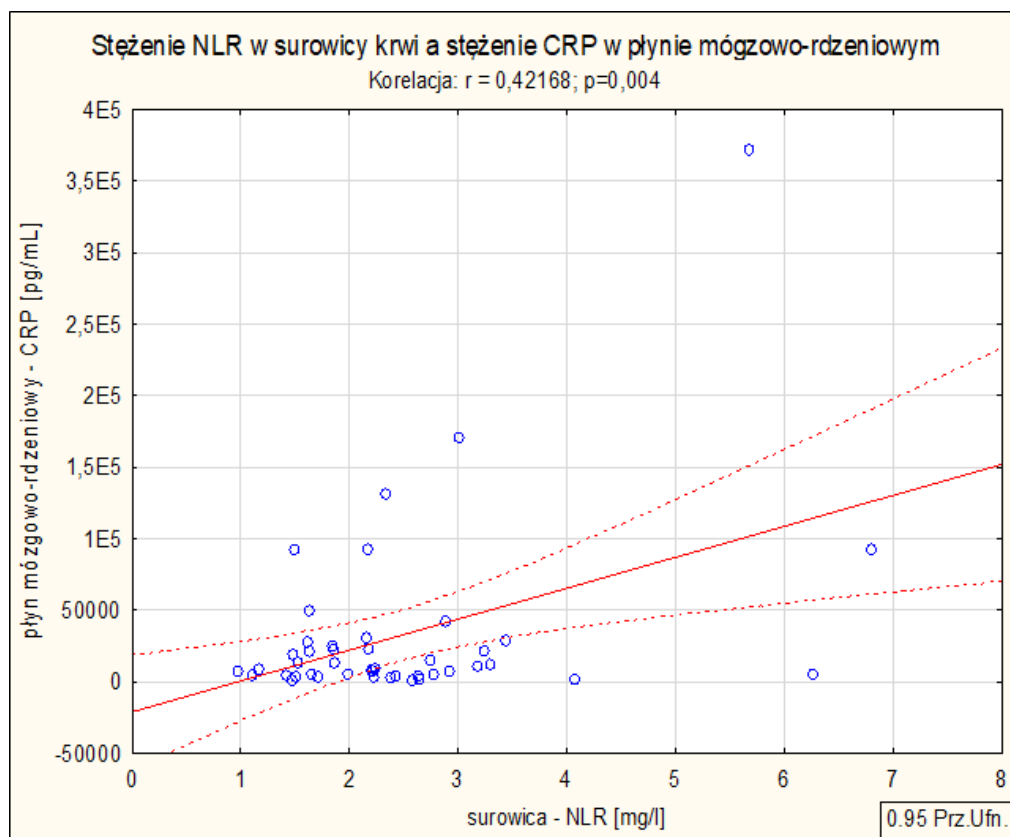
2) związek pomiędzy liczbą neutrofilów we krwi i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Stwierdzono istotną statystycznie, przeciętną, dodatnią korelację ze stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej ($R=0,36$ przy $p=0,018$); rycina 12.



Rycina 12. **Korelacja pomiędzy liczbą neutrofilów we krwi a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.**

3) związek pomiędzy liczbą limfocytów we krwi i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

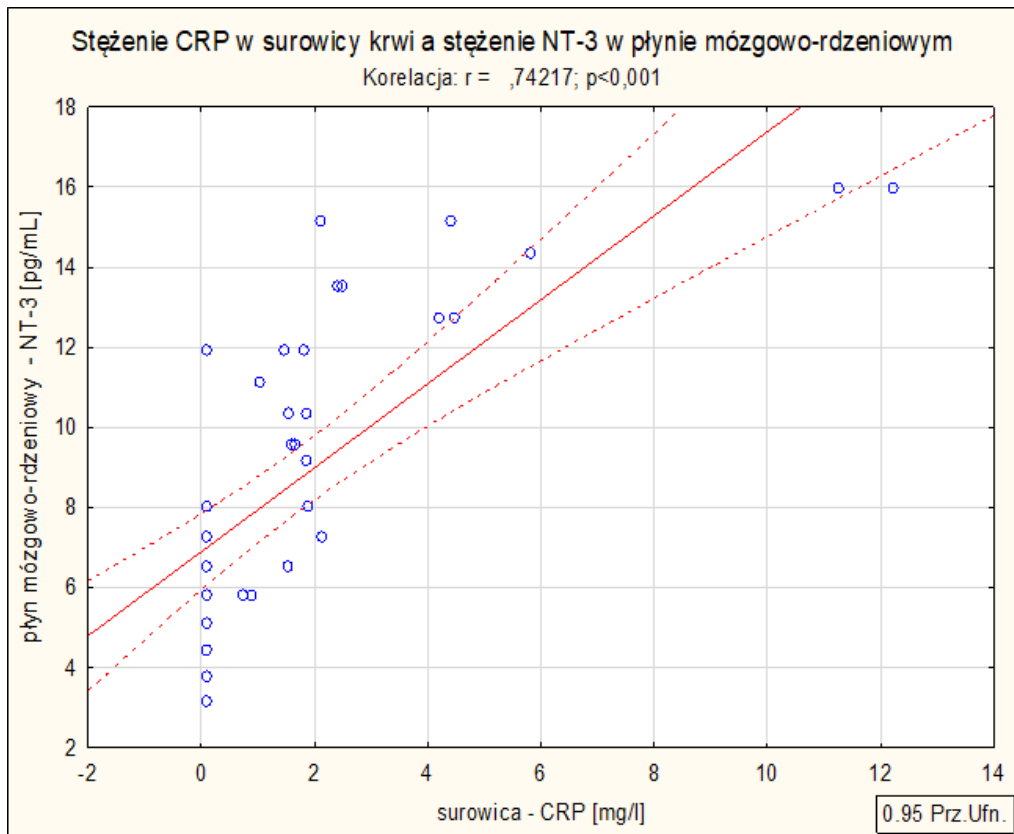
4) związek pomiędzy wskaźnikiem NLR i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Stwierdzono istotną statystycznie, przeciętną, dodatnią korelację ze stężeniem CRP w PMR w grupie badanej ($R=0,42$ przy $p=0,004$); rycina 13.



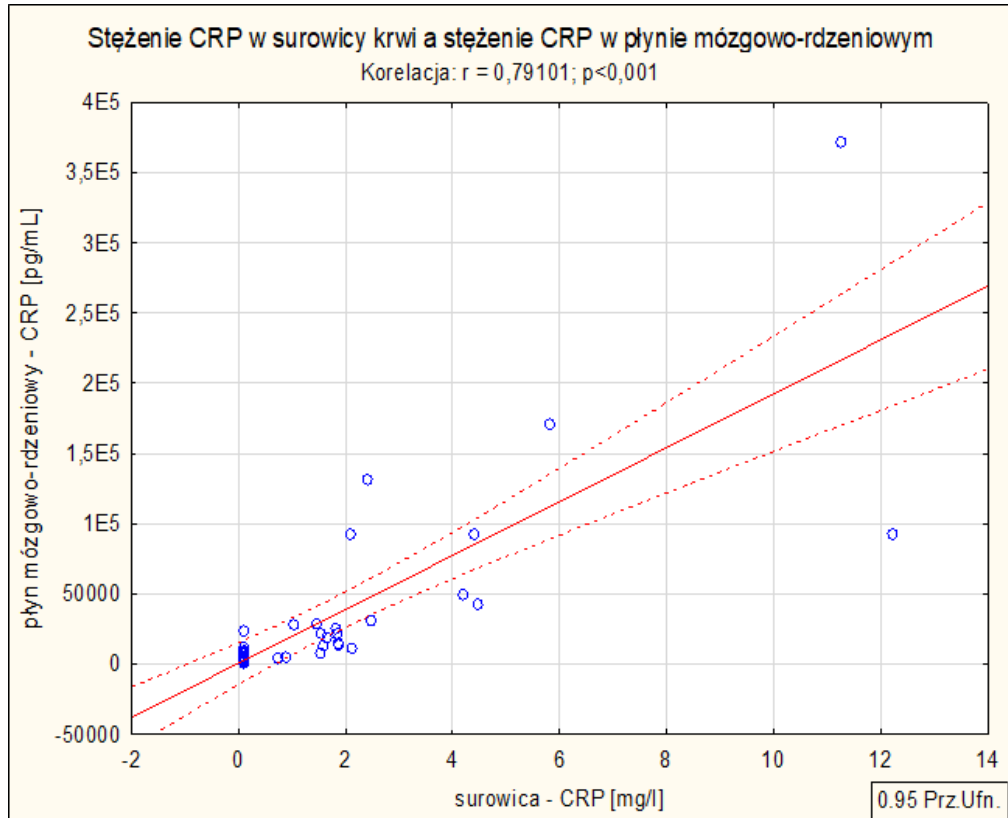
Rycina 13. Korelacja pomiędzy wartościami NLR a stężeniem CRP w PMR w grupie badanej.

5) związek pomiędzy stężeniem CRP w osoczu i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Stwierdzono istotne statystycznie, bardzo silne, dodatnie korelacje:

- ze stężeniem NT-3 w grupie badanej ($R=0,74$ przy $p=0,000$); rycina 14 i w grupie kontrolnej ($R=0,79$ przy $p=0,000$),
- ze stężeniem CRP w PMR w grupie badanej ($R=0,79$ przy $p=0,000$); rycina 15 i w grupie kontrolnej ($R=0,73$ przy $p=0,000$).

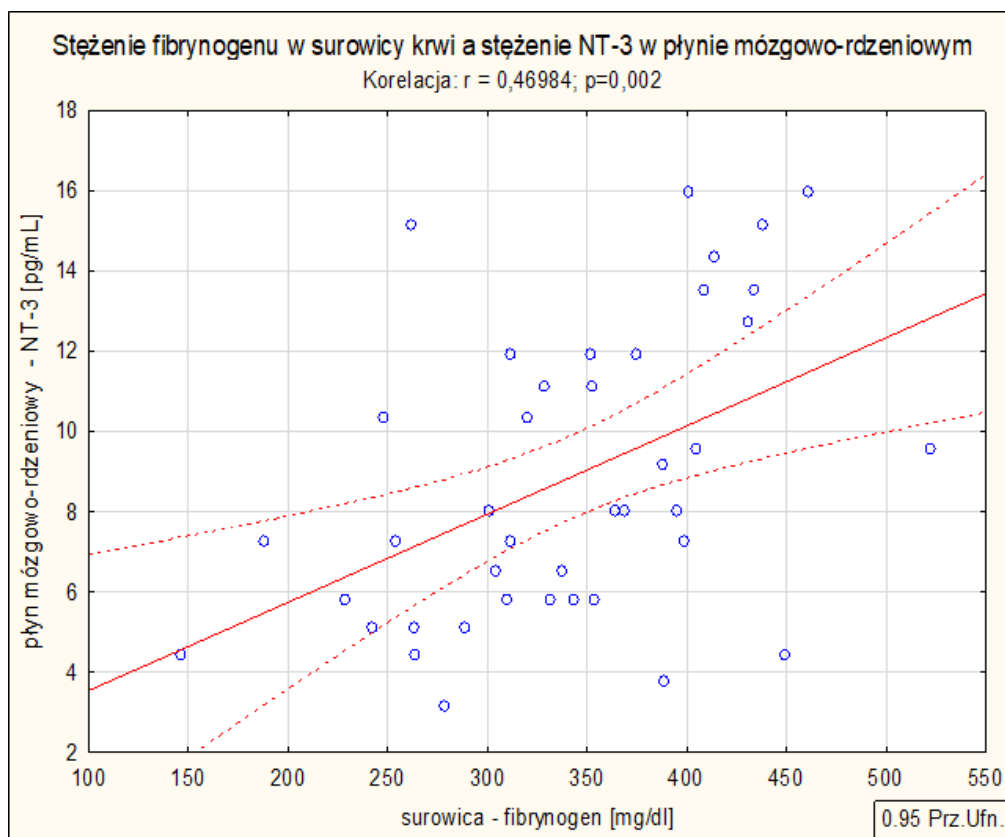


Rycina 14. Korelacja pomiędzy stężeniem CRP w osoczu a stężeniem NT-3 w PMR



Rycina 15. Korelacja pomiędzy stężeniem CRP w osoczu a stężeniem CRP w PMR w grupie badanej.

6) związek pomiędzy stężeniem fibrynogenu w osoczu i stężeniem BDNF, NT-3, CRP oraz TNFR-1 w PMR. Stwierdzono istotną statystycznie, przeciętną, dodatnią korelację ze stężeniem NT-3 w grupie badanej ($R=0,47$ przy $p=0,002$); rycina 16.



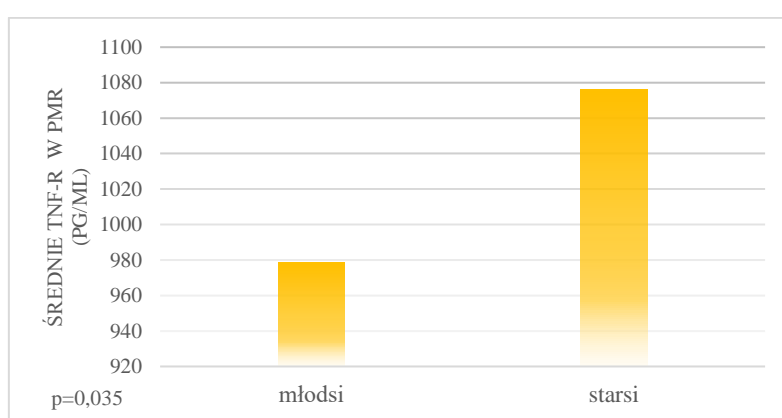
Rycina 16. Korelacja pomiędzy stężeniem fibrynogenu w osoczu a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

4.4 ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY PARAMETRAMI KRWI/PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO A STANEM FUNKCJONALNYM CHORYCH Z ALS.

W celu analizy statystycznej, dokonano podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od niższych lub wyższych wartości parametrów opisujących chorych.

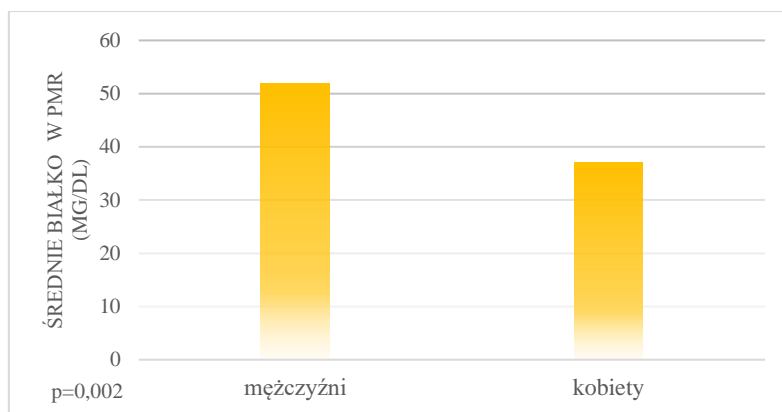
Następnie porównano wartości parametrów krwi i PMR w podgrupach oraz poszukiwano korelacji między porównywanymi wcześniej danymi.

Jako pierwszą oceniono różnicę pomiędzy podgrupami chorych młodszych i starszych w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężenia CRP i fibrynogenu we krwi, wskaźnika NLR oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Stwierdzono istotnie wyższe stężenia TNFR-1 u pacjentów starszych ($1076,22 \text{ pg/mL} \pm 176,29$ vs. $978,38 \text{ pg/mL} \pm 164,72$, $p=0,035$); rycina 17. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między wiekiem a badanymi parametrami.



Rycina 17. Porównanie stężenia TNFR-1 w PMR w grupach zależnie od wieku.

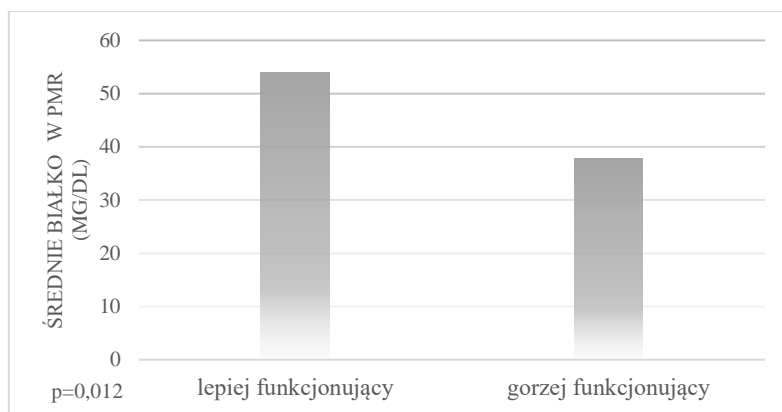
Analizie poddano różnicę pomiędzy kobietami i mężczyznami w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężenia CRP, fibrynogenu, wskaźnika NLR we krwi oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Wykazano istotnie wyższe stężenia białka całkowitego w PMR u mężczyzn ($51,95 \text{ mg/dl} \pm 21,1$ vs. $37 \text{ mg/dl} \pm 21,1$, $p=0,002$); rycina 18. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między płcią a wymienionymi badanymi parametrami.



Rycina 18. Porównanie stężenia białka w PMR w grupach zależnie od płci.

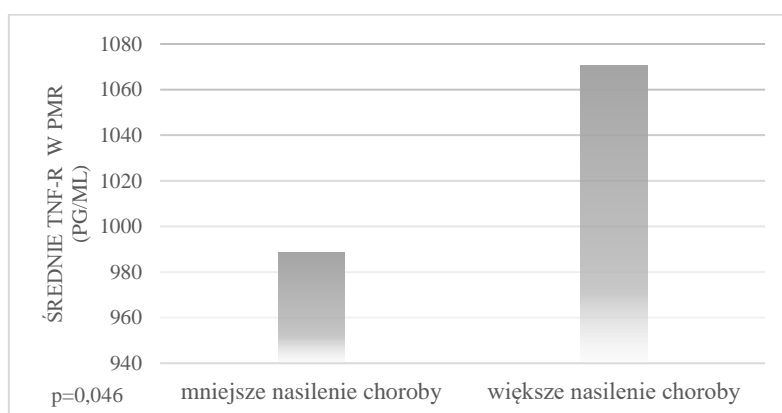
Zbadano również różnicę pomiędzy podgrupami z krótszym i dłuższym czasem trwania choroby oraz kończynową i opuszkową postacią choroby w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężeń CRP, fibrynogenu we krwi, wskaźnika NLR oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Nie stwierdzono istotnych statystycznie dysproporcji między podgrupami. Nie wykazano także istotnych statystycznie zależności między czasem trwania choroby oraz postacią choroby a badanymi parametrami.

Oceniano także różnicę pomiędzy podgrupami z lepszym i gorszym codziennym funkcjonowaniem badanym w skali ALSFRS-R w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężeń CRP, fibrynogenu we krwi, wskaźnika NLR oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Stwierdzono istotnie wyższe stężenia białka całkowitego w PMR u chorych lepiej funkcjonujących ($53,92 \text{ mg/dl} \pm 24,84$ vs. $37,81 \text{ mg/dl} \pm 17,14$, $p=0,0120$: rycina 19). Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między analizowanymi parametrami a funkcjonowaniem chorych ocenionym skalą ALSFRS-R.



Rycina 19. Porównanie stężenia białka w PMR w grupach zależnie od codziennego funkcjonowania (ALSFRS).

W następnej kolejności analizowano różnicę pomiędzy podgrupami z mniejszym i większym nasileniem choroby ocenianym w skali Norrisa w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężeń CRP, fibrynogenu we krwi, wskaźnika NLR oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Wykazano istotnie wyższe stężenia TNFR-1 w PMR u chorych z większym nasileniem choroby ($1070,62 \text{ pg/mL} \pm 198,74$ vs. $988,43 \text{ pg/mL} \pm 142,71$, $p=0,046$); rycina 20. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między wynikami w skali Norrisa a wymienionymi badanymi parametrami.



Rycina 20. Porównanie stężenia TNFR-1 w PMR w grupach zależnie od nasilenia choroby (skala Norrisa).

Badaniu poddano także różnicę pomiędzy podgrupami z lepszą i gorszą QoL ocenioną w skali ALSAQ-40 w zakresie liczby leukocytów, neutrofilów, limfocytów, stężeń CRP, fibrynogeny we krwi, wskaźnika NLR oraz stężeń BDNF, NT-3, CRP, TNFR-1 i białka całkowitego w PMR. Nie stwierdzono istotnych statystycznie dysproporcji między podgrupami. Nie wykazano także istotnych statystycznie zależności między QoL a badanymi parametrami.

5. DYSKUSJA

5.1 ZWIĄZKI MIĘDZY OCENIANYMI PARAMETRAMI KRWI I PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

Głównym celem niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy stężeniem markerów zapalnych krwi obwodowej a stężeniem wybranych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów chorych na ALS oraz wśród osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. W dotychczasowym piśmiennictwie dostępne są pojedyncze prace dotyczące takich związków.

Biorąc pod uwagę prowadzone obecnie badania dotyczące związku zapalenia toczącego się w OUN z etiologią ALS wydaje się, że białko C-reaktywne jest potencjalnym, wiarygodnym markerem tej choroby [332-334]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac oceniających związku CRP z parametrami PMR u chorych na ALS. Natomiast Akil et al. [335] donosili o zależności pomiędzy NLR a stężeniem białka C-reaktywnego w osoczu chorych z innym schorzeniem neurodegeneracyjnym, PD. Powyższy wynik mógłby sugerować istnienie zależności pomiędzy zapaleniem obwodowym a lokalnym toczącym się w OUN. Jak wskazują badania na gryzoniach [207] ogólnoustrojowy stan zapalny, poprzez produkcję cytokin, może przerywać ciągłość bariery krew-mózg i powodować infiltrację krwinek białych do PMR. Także głą i same neurony produkując $TNF\alpha$ i reaktywne formy tlenu mogą lokalnie przyczyniać się do uszkodzenia tej bariery [127,302] i przedostawania się białka C-reaktywnego do OUN.

W naszym badaniu stwierdziliśmy obecność licznych związków stężenia CRP w osoczu - zarówno z innymi parametrami zapalnymi, jak i z neurotrofinami. Istotnie wyższe stężenie CRP w PMR chorych z ALS obserwowano w grupach z: wyższymi wartościami neutrofilów, wyższymi wartościami limfocytów oraz w grupie w wyższymi

wartościami fibrynogenu we krwi. Wykazano także korelacje pomiędzy stężeniem CRP w PMR a wartościami NLR (przeciętną) oraz stężeniem CRP w osoczu chorych (bardzo silną).

To, czy CRP jest rzeczywiście istotnym składnikiem ścieżki etiopatogenetycznej w ALS, czy jedną z wielu substancji wciągniętych w ciąg reakcji prowadzących do choroby, jest na ten moment trudne do pewnego ustalenia. Biorąc jednak pod uwagę dotychczasowe badania i coraz pewniejszy udział stanu zapalnego, wydaje się, że powinniśmy traktować CRP bardziej jak marker prognostyczny, mówiący o stopniu nasilenia choroby i ew. skuteczności leczenia, niż diagnostyczny. Przemawia za tym fakt nieswoistości CRP dla neurodegeneracji w ALS.

Co ciekawe, uzyskaliśmy także bardzo silną korelację między stężeniem CRP w osoczu a w PMR również u osób zdrowych. Interpretacja tego wyniku jest niejednoznaczna. Do tej pory sądzono bowiem, że przy niskich stężeniach w krwi obwodowej CRP nie przekracza bariery krew-mózg, a produkcja tego białka lokalnie w OUN (przez neurony, głąz lub komórki immunologiczne) była wiązana i wykrywana jedynie w warunkach patologicznych, na przykład w chorobach neurozwyrodnieniowych [188,336,337]. Donoszono, że dopiero wyższe stężenie CRP we krwi zwiększa przepuszczalność bariery krew-mózg i poprzez upośledzenie funkcji głązu oraz neuronów powoduje m.in. pogorszenie funkcji poznawczych [338-340]. Za dawkę „progową” uznano stężenie 2,5 mg/l, będące dalej wartością prawidłową. W naszym badaniu stężenie CRP > 2,5 mg/l dotyczyło 20% osób z grupy kontrolnej.

Podobne wyniki uzyskiwano już wcześniej, między innymi u osób badanych z powodu agresji [341,342] oraz u byłych sportowców [343]. Możemy zatem przypuszczać, że CRP albo przenika barierę krew-mózg nawet przy prawidłowych – niskich wartościach na obwodzie, albo jest produkowane w OUN nawet u osób

zdrowych. Komórki immunologiczne komunikując się ze sobą za pomocą cytokin, mogą pobudzać powstawanie niewielkiego stanu zapalnego również poza barierą krew-mózg, pomimo że źródło znajduje się przed nią.

Jak wspomniano wcześniej, przyjmuje się, że stężenie BDNF wzrasta w początkowej, ostrej fazie zakażenia/choroby, a następnie zmniejsza w fazie przewlekłej [272]. Wydawałoby się, że w chorobach zwyrodnieniowych sytuacja może być podobna. Produkcja neurotrofiny z czasem trwania choroby wyczerpuje się, co powoduje mniejszą ochronę i postępującą patologię neuronów. Z drugiej strony nieprawidłowości w funkcjonowaniu BDNF powodowałyby wtedy większe narażenie układu nerwowego na uszkodzenie i być może grałyby rolę przyczynową w neurodegeneracji, także w ALS.

Wynik niniejszego badania może częściowo wspierać te przypuszczenia. Stężenie BDNF okazało się być wyższe w grupach chorych z ALS z wyższym fibrynogenem oraz w grupach z niższym CRP w osoczu. Niższe BDNF stwierdzono w grupie chorych z wyższym stężeniem CRP sugerującym większe nasilenie stanu zapalnego związanego ze schorzeniem. Można to interpretować jako „wyczerpanie” neurotrofiny w bardziej zaawansowanym stadium ALS, albo większe nasilenie stanu zapalnego u pacjentów z deficytem BDNF. Przeciwnie wnioski można by wyciągnąć biorąc pod uwagę wyniki naszej pracy uzyskane dla innego białka ostrej fazy, fibrynogenu. Związek BDNF z fibrynogenem komplikuje jednak rolę obu substancji w kaskadzie krzepnięcia. Fibrynogen ma oczywiste działanie prozakrzepowe. Natomiast piśmiennictwo sugeruje w ostatnich latach, że BDNF odgrywa odwrotną rolę, promującą lizę zakrzepu [344]. Do chwili obecnej w zakresie parametrów zapalnych badacze odnajdywali wyłącznie związek BDNF z NLR. Obie substancje oznaczano jednak wyłącznie w osoczu [345]. W naszym badaniu nie wykryto związku wartości NLR ze stężeniem BDNF w PMR.

Z dotychczasowego piśmiennictwa wynika, że NT-3 jest substancją charakterystyczną raczej dla aktywnych procesów w OUN, której stężenie zmniejsza się w schorzeniach związanych z atrofią mózgowia. Wydaje się, że różnica pomiędzy działaniem NT-3 w warunkach schorzeń ostrych i przewlekłych jest mediowana przez układ odpornościowy, zwłaszcza limfocyty T CD4+. Co więcej, gen receptora TrkC wykazuje ekspresję tylko w limfocytach pomocniczych Th2, a nie Th1 czy Th17, więc wobec ich braku, działanie neurotrofiny byłoby na pewno ograniczone. Brak odpowiednich warunków immunologicznych uniemożliwia terapeutyczne dla neuronów działanie NT-3 [346,347]. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, w badaniach pośmiertnych pacjentów z ALS stwierdzano raczej zmniejszone ilości receptora TrkC niż samego NT-3, co sugerowałoby istnienie ewentualnej patologii raczej w zakresie receptora. Wobec tego, możliwa jest też sytuacja, w której wraz ze wzrostem parametrów zapalnych w przebiegu choroby dochodzi do zaburzenia równowagi Th1/Th2 i zmniejszenia stężenia TrkC. Organizm próbuje wtedy rekompensować utratę funkcji receptora zwiększeniem ilości NT-3 we krwi, co mogłoby tłumaczyć uzyskane przez nas wyniki. W toku dalszych badań, aby ocenić słuszność tej hipotezy, należałoby poszerzyć panel oznaczeń o receptory Trk oraz podzielić limfocyty według typów. W tej pracy brakowało tego podziału, wobec czego nie uzyskano związków NT-3 z limfocytami – ich całkowita ilość mogła się bowiem nie różnić mimo dominacji innego podtypu komórek.

W naszym materiale najbardziej aktywną neurotrofiną w stanie zapalnym okazała się NT-3. Wykazano, że stężenie tej substancji w PMR jest wyższe w grupach z wyższymi wartościami CRP i fibrynogenu. Ponadto wykryto korelacje z większością parametrów zapalnych badanych we krwi pacjentów - leukocytami, neutrofilami, fibrynogenem oraz CRP, z czego związek z tym ostatnim okazał się bardzo silny. Stwierdzono także bardzo silną korelację pomiędzy NT-3 a CRP osocza u osób zdrowych. Nasze badania wydają się

potwierdzać, że NT-3 jest neurotrofiną odpowiedzialną za reakcję na stan zapalny, zarówno ośrodkowy jak i obwodowy. Jej elewację u osób zdrowych można wytłumaczyć podobnie jak wzrost CRP – interakcją stymulowaną przez przechodzące przez barierę krew-mózg cytokiny.

5.2 PORÓWNANIE PARAMETRÓW PACJENTÓW I OSÓB ZDROWYCH

W drugiej części głównego celu niniejszej pracy założono dokonanie porównania badanych parametrów krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego pomiędzy grupą badaną i kontrolną.

5.2.1 Leukocyty

We wcześniejszych badaniach dotyczących ALS kwestia krwinek białek w kontekście zapalenia OUN była już podnoszona, szczególnie, że blokowanie nacieku komórek odpornościowych przez barierę krew-mózg zwiększa przeżycie i zmniejsza objawy motoryczne u chorych myszy [348]. Murdock et al. [349] stwierdzili, że w ALS obserwuje się wzrost wszystkich typów leukocytów we krwi, jednak w innych badaniach wyniki były różne [350,351,352].

W kilku pracach dotyczących granulocytów we krwi obwodowej chorych z ALS stwierdzano podwyższone poziomy neutrofilów oraz, rzadziej, stosunku neutrofilów do agranulocytów, co korelowało z szybkością postępu choroby, ale też np. z gorszą wydolnością oddechową czy hipermetabolizmem [28,107,349,353-356]. Ponadto, wyższa liczba neutrofilów przy rozpoznaniu wiązała się z krótszym przeżyciem, znamienne zwłaszcza u płci żeńskiej [355,357,358], co tłumaczono wpływem hormonów płciowych na aktywność neutrofilów i cytokin (działanie immunomodulujące) i zmiennością układu odpornościowego [209]. Tylko w jednym badaniu, dość nietypowym, bo opartym na

metodzie randomizacji Mendla, stwierdzono, że genetycznie uwarunkowana zwiększona liczba neutrofilów była powiązana ze zmniejszonym ryzykiem ALS [350]. W innej pracy wyższy poziom neutrofilów oraz NLR wiązał się z wyższym ryzykiem rozwoju ALS w przyszłości [359].

Badania dotyczące limfocytów we krwi chorych z ALS pozostają niejednoznaczne. W niektórych stwierdza się wzrost ich ilości we krwi [360,361] oraz rdzeniu kręgowym pacjentów [143], w innych nie uzyskuje się różnicy w porównaniu do osób zdrowych [362]. W większości jednak mówi się o tendencji spadkowej, która na dodatek związana jest z szybszym postępem objawów i większym ryzykiem zaburzeń funkcji poznawczych [349,363,364]. W jednym z badań niekorzystny wpływ małej liczby limfocytów na rokowanie stwierdzono u kobiet, ale nie u mężczyzn [355].

Neuroprotekcja związana z limfocytami T CD4⁺ w ALS wynika prawdopodobnie z ich interakcji z mikroglejem i astrocytami oraz z wydzielaniem przez nie neurotrofin.

Donoszono o zwiększeniu liczby komórek CD8⁺ w ALS w stosunku do zdrowych kontroli [143,361,365], czasami jednak okazywała się ona też niższa [360] lub taka sama [362]. Prawdopodobnie w dużym stopniu zależy to od etapu choroby. W pracach bardziej szczegółowych, badających wpływ różnych subpopulacji limfocytów komórki CD4⁺ miały różne działanie w zależności od podtypu (innych CD) – Th1 i Th17 niekorzystne, Th2 i T regulatorowe ochronne, a CD8⁺ były szkodliwe i dodatnio powiązane z ryzykiem zgonu [366-368]. Taki podział potwierdza fakt, że receptor TrkC pozwalający na protekcyjne działanie NT-3 wykazuje ekspresję na Th2, a nie na Th1 i Th17 [347].

Ponadto, jak udowodnili Beers et al. [369] same limfocyty mogą być dysfunkcyjne – komórki T regulatorowe pacjentów z ALS wykazywały zmniejszone zdolności tłumienia proliferacji limfocytów T pomocniczych w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Co ciekawe, komórki te odzyskiwały swe normalne zdolności po usunięciu z chorego

organizmu i namnażaniu *in vitro*. [369,370]. We krwi obwodowej pacjentów z ALS rośnie także liczba komórek typu NK [371,372], co dodatkowo wiąże się z niższym ryzykiem zgonu [367]. Limfocyty B wydają się nie mieć dużego znaczenia w chorobie [224]. Badania dotyczące limfocytów są trudne do porównania; niektóre dotyczą całości tej grupy, inne komórek B, T i NK, a tylko nieliczne dzielą je wg antygenów różnicowania komórkowego. W związku z tym podjęto próby profilowania chorych wg limfocytowych klas CD, gdzie okazało się, że wyróżnione profile z wyraźnie rozpoznawalnymi różnicami immunologicznymi różnią się także cechami klinicznymi, m.in. przeżyciem. [361,367,373]. Limfocyty T mają szczególne znaczenie w patogenezie ALS z uwagi na ich interakcję z neurotrofinami. W warunkach uszkodzenia OUN limfocyty T, zwłaszcza Th1 [374], wykazują zdolność do produkcji BDNF oraz NT-3 i do naprawy neuronów [375]. Udowodniono także, że na komórkach Th2 znajduje się receptor TrkC wywołujący ochronne działanie NT-3 [347,376]. Jak wspomniano wyżej, brak równowagi Th1/Th2 może więc wpływać na naprawę neuronów przez neurotrofiny [347]. Wydaje się, że te interakcje między poszczególnymi limfocytami, między limfocytami a neurotrofinami lub nawet defekty samych limfocytów mogą mieć pewne znaczenie w patogenezie ALS. W celu potwierdzenia tej hipotezy należałoby jednak przeprowadzić badania z oznaczeniem subpopulacji tych komórek, co nie było celem naszej pracy.

W opublikowanym przed kilkunastu laty prospektywnym badaniu kohortowym udowodniono istnienie w ALS ogólnoustrojowego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, co wykrywano poprzez podwyższoną liczbę leukocytów i NLR [19]. W pracy Leone et al. [377] wyższe wartości NLR skorelowano z szybszym tempem postępu choroby oraz wyższą umieralnością – za punkt odcięcia uznano wartość 2,315 po przekroczeniu której współczynnik umieralności był dwukrotnie większy. Wei et al. [378], Grassano et al. [355] oraz Choi et al. [379], podobnie, potwierdzili związek

wyższego NLR z niewydolnością oddechową, szybszą progresją choroby i krótszym przeżyciem, choć zwrócili także uwagę na starszy wiek zachorowania w tych grupach.

W naszym materiale stwierdziliśmy istotną statystycznie różnicę w zakresie liczby krwinek białych pomiędzy grupami, z wyższą ilością leukocytów w grupie zdrowej. W grupie kontrolnej stwierdzono również wyższą liczbę neutrofilów i limfocytów, choć nie osiągnięto tu istotności statystycznej. Ponadto, w przeliczeniu na procentowy udział tych krwinek w całkowitej liczbie leukocytów okazało się, że stosunki te są bardzo podobne dla obu grup. W przeciwieństwie do wielu innych wcześniejszych badań, obliczony przez nas dla obu grup, badanej i kontrolnej, NLR okazał się podobny i nieistotny statystycznie.

5.2.2 Białko C-reaktywne

Keizman et al. [19] w pracy z 2009r. zaobserwowali podwyższenie stężenia CRP we krwi chorych z ALS w porównaniu do zdrowych kontroli. W innym badaniu w 2017r. [380] stwierdzano, co prawda, zwiększone poziomy CRP u chorych na ALS, lecz ich związek z ryzykiem zachorowania, ani z przeżyciem nie był ewidentny. Takim samym rezultatem zakończyło się inne badanie z tego samego roku [22], gdzie dodatkowo zasugerowano, że źródłem CRP może być lokalne zapalenie w OUN. W innych pracach stwierdzano: podwyższone CRP u chorych (w porównaniu do kontroli) w osoczu [381] i w PMR [382], wzrost CRP tylko u osób z mutacją *C9orf72*, ale nie w innych typach ALS [383], brak związku poziomu CRP z przeżyciem chorych [384], brak związku genetycznie predysponowanego poziomu CRP z późniejszym ryzykiem ALS [385], ale za to zwiększone ryzyko zachorowania na ALS u osób z wyższym stężeniem CRP w latach poprzedzających rozpoznanie [386]. W 2022r. w przeglądzie systematycznym prac [387] obejmującym ponad 2,5 tys. chorych i prawie 3,5 tys. kontroli stwierdzono, że stężenie

CRP w ALS jest wyższe. Badania związku CRP z postacią i objawami ALS są nieliczne. W dostępnych stwierdzono m.in., że mniejsze stężenie CRP wiąże się z pogarszającą się pojemnością życiową płuc u chorych [388]. Wykazano również dodatnią korelację między CRP, a stopniem uszkodzenia dolnego neuronu ruchowego [389].

W naszej pracy CRP było oceniane w osoczu krwi i PMR. W osoczu nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami. W PMR stężenie CRP było wyższe, chociaż nieistotnie statystycznie, wśród pacjentów z ALS.

5.2.3 Fibrynogen

W ALS, jeszcze przed wystąpieniem zwyrodnienia neuronów ruchowych i zapalenia nerwowo-naczyniowego, dochodzi do zaburzenia przepuszczalności bariery krew-mózg [390]. Nieprawidłowości te można zobaczyć badając sploty naczyńkowe chorych z ALS, w których obserwuje się zakłócenia w ścisłych połączeniach warstwy nabłonkowej, integralności naczyń oraz okołonaczyniową utratę perycytów [391]. U pacjentów zarówno z sALS, jak i fALS uwidoczniono znaczne okołonaczyniowe depozyty fibryny w porównaniu z grupą kontrolną [392]. Analizy autopsyjne także ujawniły akumulację fibryny w obszarach istoty szarej gęsto zagęszczonych neuronami ruchowymi. Szczególnie w rogu przednim rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym [393]. Wiemy także, że poprzez wpływ fibrynogenu dochodzi m.in. do aktywacji mikrogleju, powstania stresu oksydacyjnego (poprzez receptor CD11b/CD18), dysfunkcji mitochondriów czy promowania zapalenia układu nerwowego, które to czynniki mają swoje udowodnione miejsce w patogenezie ALS. Wzajemne oddziaływanie stanu zapalnego i układu krzepnięcia może być więc ważnym tematem dalszych prac. Wyższy osoczowy poziom fibrynogenu opisywano u chorych w porównaniu do zdrowych kontroli [19]. W badaniu z 2021r. mierzono stężenie fibrynogenu γ we krwi, który w normalnych

warunkach stanowi 8% całkowitej ilości tego białka, co zwiększa się w przypadku stanu zapalnego. Okazało się, że było ono znacząco wyższe u pacjentów z ALS niż w grupie kontrolnej. Udowodniono także niezależny związek pomiędzy wyższymi poziomami fibrynogenu γ i dłuższym przeżyciem. Sugerowany tu efekt ochronny może w kontekście wcześniejszych informacji zaskakiwać. Autorzy spekulowali, że z jakiegoś powodu mogło dojść do przejścia mikrogleju w stan M2 [394].

W naszym badaniu stwierdziliśmy wyższy wśród pacjentów z ALS poziom fibrynogenu, co jest zgodne z dotychczasowym piśmiennictwem.

5.2.4 Neurotrofiny

W dostępnym piśmiennictwie znajdujemy informacje o podwyższonym stężeniu NGF u chorych z ALS, chociaż tempo ich narastania bywa różne. W rdzeniu kręgowym myszy z ALS rośnie ono na początku choroby, jeszcze w okresie przedobjawowym, a z czasem zaczyna spadać [395]. W ludzkim modelu opisywano wzrost NGF proporcjonalny do czasu trwania choroby [396]. W badaniach pośmiertnych chorych z ALS stwierdzano natomiast zwiększone ilości NT, w tym NGF, w mięśniach poprzecznie prążkowanych [250]. Większe stężenie NGF w mięśniach niekoniecznie wiąże się jednak z patologią nerwową. Okazało się, że dużo wyższe jego wartości są obserwowane u ludzi uprawiających wyczynowo sport [397]. W badaniu Ferraiuolo et al. [398] z 2011r., w którym porównywano astrocyty rdzenia kręgowego myszy zdrowych i myszy z mutacją SOD1 (presymptomatycznych w zakresie ALS), stwierdzono u tych drugich zwiększoną produkcję NGF z dysregulacją stosunku proNGF i NGF, a także zwiększoną ekspresję i aktywację proapoptotycznego (zwykle) receptora p75. Kim et al. [399] stwierdzili, że poddanie NGF modyfikacji poprzez potranslacyjny stres glikacyjny powoduje przekształcenie go w formę z większym powinowactwem do receptora p75,

a więc proapoptotyczną. Obecność tak zmodyfikowanego NGF oraz zwiększonej ekspresji receptora p75 udowodniono w rdzeniu kręgowym myszy z objawami ALS. Ponadto stwierdzono, że apoptoza zdrowych motoneuronów, indukowana podaniem ekstraktu z takiego rdzenia, przebiega zależnie od ww. receptorów, a zablokowanie tej drogi ma działanie antyapoptotyczne. Zwiększone ilości p75 stwierdzano także w moczu chorych z ALS w porównaniu do zdrowych kontroli [400].

Niestety w naszym materiale większość oznaczeń NGF-beta w PMR była poniżej granicy oznaczoności, co nie pozwoliło nam ustosunkować się do dotychczasowych doniesień.

W pracy na podstawie badań pośmiertnych [401] funkcjonowanie zdrowych motoneuronów rdzenia kręgowego wydawało się być zależne głównie od BDNF oraz NT-3, i zmieniało się u chorych z ALS. U chorych ekspresja BDNF była znacznie niższa, zwiększała się natomiast zależność neuronów od NGF. Ponadto, podawanie zdrowym szczurom PMR pacjentów z ALS powodowało istotne zmniejszenie ekspresji BDNF w szurzych motoneuronach [268,402]. Do tej pory niewielu badaczy oceniało stężenie BDNF u chorych z ALS, a uzyskane wyniki nie różniły się istotnie pomiędzy grupą badaną a zdrowymi kontrolami. Dotyczyło to zarówno BDNF we krwi [403,404], jak i PMR [24,404]. Dopiero badania sprzed 2 lat [405,406] (w jednym z nich rozróżniono formę prekursorową i dojrzałą białka), pozwoliły wykazać, że stężenia BDNF w osoczu różnią się w porównaniu ze zdrową populacją. Stężenie BDNF jest istotnie wyższe, a pro-BDNF istotnie niższe u chorych z ALS. Dodatkowo niższe stężenie pro-BDNF było związane z krótszym przeżyciem. Różnice te nie dotyczyły jednak pacjentów z mutacją C9orf72. W innych pracach pomiarów dokonywano w mięśniach szkieletowych, stwierdzając albo zwiększone stężenie BDNF (i innych NT) w mięśniach kończyny górnej w badaniach autopsyjnych chorych z ALS [250] albo jego obniżone stężenie

w mięśniach kończyn u myszy (przy prawidłowym stężeniu w mięśniach gałkoruchowych, które tak rzadko są zajęte w ALS) [407,408]. Należy także wspomnieć, że podjęto próby podawania BDNF pacjentom z ALS [409,410]. Nie uzyskano zwiększenia długości życia chorych, mimo, że badania in vitro i w modelu zwierzęcym były obiecujące [268,277,407,411]. Obserwowano jedynie niewielką poprawę stanu neurologicznego. Być może dla inicjacji neuroprotekcynowego działania BDNF potrzebny jest dodatkowy czynnik/czynniki [277].

W naszej pracy stwierdziliśmy istotnie wyższe stężenie BDNF w grupie chorych z ALS, co jest zgodne z ostatnimi badaniami w tym zakresie.

W przeszłości badania sekcyjne wykazały zmniejszone ilości TrkC, głównego receptora NT-3, w rdzeniowych motoneuronach chorych na ALS oraz zdrowych kontroli, przy zmniejszonej ilości samej NT-3 tylko u chorych [412]. W tkance mięśniowej w miarę rozwoju choroby obserwowano obniżające się stężenie NT-3, co było znaczące w kończynach i dużo słabiej wyrażone w mięśniach gałkoruchowych [407,413].

Podawanie NT-3 pacjentom po udarze mózgu oraz osobom zdrowym z grupy kontrolnej zmniejszało odsetek aktywnych monocytów oraz limfocytów T CD4+ i CD8+, a także zmniejszało poziom większości badanych cytokin prozapalnych. Działanie to odbywało się także przez regulację ilości TrkC na tych komórkach. [414]. Wydaje się więc, że NT-3 ma za zadanie w pewien sposób przeciwdziałać rozszerzaniu się stanu zapalnego.

Podobne wyniki ukazujące ochronne działanie NT-3 w stanie zapalnym wykazano u chorych z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych [415,416] oraz zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego [417]. Biorąc pod uwagę wszystkie te doniesienia istotnym jest, że NT-3, produkowane głównie przez Th1, wydaje się wywierać swoje działanie neuroprotekcynowe jedynie podczas aktywacji immunologicznej i to w ostrej, a nie w przewlekłej fazie choroby, za pomocą limfocytu o fenotypie Th2 [346,376,418]. Tak

jak w przypadku innych neurotrofin znaczenie ma również to, czy dominuje forma dojrzała czy prekursorowa NT-3 [419].

Podobnie jak BDNF, także NT-3 w niniejszym badaniu okazała się istotnie wyższa w grupie badanej, co wiązało się większym nasileniem stanem zapalnego.

5.2.5 Czynniki martwicy nowotworów

Jak wspomniano we wstępie badania nad stężeniem TNF α w chorobach neurodegeneracyjnych często dawały sprzeczne wyniki. W dotychczas opublikowanych pracach nt. ALS, stwierdzano podwyższone poziomy TNF α w materiale sekcyjnym z rdzenia kręgowego pacjentów i presymptomatycznych myszy [420-422]. W osoczu pacjentów z ALS wzrost ten był wprost proporcjonalny do czasu trwania choroby [6,423-425]. Rosło też jego stężenie w PMR [426], a nawet w komórkach naskórka, również wprost proporcjonalnie do czasu trwania choroby [427].

Stężenie receptorów TNF we krwi i w PMR (tu zwłaszcza TNFR-2) również się zwiększa, ale w OUN ich liczba pozostaje taka sama na neuronach, obfitsze są tylko na komórkach glejowych [428, 429]. W badaniu na bliźniętach komórki krwi obwodowej spontanicznie wydzielały TNF α u chorego na ALS bliźniaka, czego nie obserwowano u bliźniaka zdrowego [430]. Co ciekawe, w pracy z wykorzystaniem kultur komórkowych szkodliwe działanie TNF α na neurony wykazano tylko w środowisku pozbawionym neurotrofin [375].

Uwzględniając całość dotychczasowych badań, wydaje się, że regulacja TNF α i jego receptorów, nawet już w presymptomatycznej fazie choroby, odgrywa rolę w etiologii i progresji ALS. Nie wiemy jednak, czy wpływ tej cytokiny rozpoczyna neurodegenerację, czy raczej jest jednym z wielu czynników obecnych w ciągu patogenetycznym, być może także neuroprotekcijnym. Różne prace sugerują często

przeciwstawne wnioski, co może wynikać z wielu czynników, w tym stężenia $TNF\alpha$, czasu trwania choroby, typu aktywowanego receptora i ścieżki sygnałowej, obecności innych substancji, czy otaczającego mikrośrodowiska, być może również od typu ALS/powodującej go mutacji [128,431].

Tak jak w przypadku NGF, wyniki oznaczeń TNF-alfa w PMR naszych pacjentów i osób zdrowych nie pozwalają na ich dalszą analizę. Choć immunofluorescencja pozostaje metodą pierwszego wyboru z uwagi na prostotę i cenę, wydaje się, że w przypadku niewielkich stężeń neurotrofin lepszym wyborem mogłaby być dokładniejsza metoda immunoenzymatyczna. Istotną różnicę na korzyść pacjentów z ALS wykryto natomiast dla receptora TNF-R1. Jako że stężenie krążących receptorów TNF zwiększa się w odpowiedzi na bodźce prozapalne wraz z aktywnością $TNF\alpha$, także ono może być wykorzystane jako marker zapalny w powiązaniu z samą cytokiną.

5.3 WPLYW BADANYCH CZYNNIKÓW NA OBRAZ CHOROBY

Celem dodatkowym niniejszej pracy było określenie związku analizowanych parametrów krwi obwodowej i PMR z wynikami uzyskanymi w skalach ALSFRS-R, Norris oraz ALSAQ-40.

Kilka opublikowanych dotychczas badań wykazało podwyższenie stężenia białka całkowitego u chorych na ALS w porównaniu do zdrowych kontroli [432,433]. W naszej pracy wyższe stężenie białka w PMR chorych wiązało się z lepszym ich codziennym funkcjonowaniem. Podobne wyniki, ale tylko dla płci żeńskiej, uzyskali Zhao et al. [432], którzy dodatkowo powiązali poziom białka z wyższym wiekiem zachorowania oraz z krótszym czasem trwania choroby.

Zdecydowanie większa liczba dostępnych prac skupiła się na ocenie związku wyników uzyskanych w skali ALSFRS-R ze stężeniem CRP. W dotychczasowym

piśmiennictwie kilkakrotnie donoszono o umiarkowanej lub silnej korelacji pomiędzy wyższym stężeniem CRP w osoczu krwi chorych i gorszym ich funkcjonowaniem [19,22,380]. Zostało to ostatecznie potwierdzone w dużym przeglądzie systematycznym [387]. Z naszej wcześniejszej pracy opublikowanej w 2020r. [332] wynikało, że istnieje umiarkowanie silna, negatywna korelacja między stężeniem CRP w PMR, a stanem klinicznym pacjentów; czego nie znaleźliśmy w przypadku osoczowego stężenia tego białka. W dużym badaniu z 2011r. również nie znaleziono takiego związku [434].

W niniejszej analizie również oceniano związek CRP z parametrami klinicznymi, dotyczącymi niesprawności związanej z ALS, nie stwierdzając istotności statystycznej żadnej zmiennej, także w przypadku ALSFRS-R.

TNFR-1, podobnie jak samo TNF α , uznaje się za marker zapalny. Kompleksy TNF- α /TNFR-1 mogą wzmacniać działanie cytokiny w przewlekłych stanach zapalnych poprzez jej powolne uwalnianie [435], a typ R1 receptora wydaje się wywoływać raczej proapoptotyczne działanie. Wykazywano także, że z czasem trwania choroby wzrasta stężenie TNF α i receptorów TNF [128]. Można więc przypuszczać, że im bardziej nasilony jest stan zapalny tym cięższe są objawy choroby. Wiemy też, że profil produkcji cytokin oraz lokalizacja receptorów TNF zmieniają się z czasem trwania choroby „przechodząc” z neuronów na komórki mikrogleju. Zwiększa się też ich ilość pomiędzy presymptomatyczną a symptomatyczną fazą choroby [315,436].

W naszej pracy badając zależności parametrów z wynikiem w skali Norrisa znaleziono istotny związek pomiędzy wyższym stężeniem receptora TNFR-1 w PMR a większym nasileniem choroby. Być może zwiększenie wydzielania TNFR-1 wraz z postępem ALS wiąże się lub ma podobną etiologię jak w przypadku przejścia mikrogleju ze stanu M2 w M1. Aby to ocenić, w kolejnych badaniach należałoby

oznaczyć łącznie stężenie TNF α , TNFR-1 i TNF-R2. Niewykluczone, że TNFR-1 mógłby zostać wykorzystany jako marker prognostyczny ALS.

5.4 DODATKOWE WYNIKI

Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie istnienia kilku interesujących wyników, które nie były przewidziane do analizy w przedstawionej pracy.

Po pierwsze, w PMR „starszych” pacjentów stwierdzono większe stężenie receptora TNFR-1. W dostępnym piśmiennictwie donoszono już o takiej zależności, ale dla stężenia receptora w surowicy krwi [306,437].

Jak już wspomniano wcześniej, „starzejący się” mikroglej przyjmuje status prozapalny, gdy czynniki patologiczne mogą łatwiej wprowadzić mózg w stan łagodnego przewlekłego zapalenia układu nerwowego, czyniąc go bardziej podatnym na sygnalizację pro-apoptotyczną. Spada też zdolność tych komórek do reagowania na bodźce. Widząc, że odpowiedź immunologiczna zmienia się z wiekiem oraz że pacjenci z ALS chorują średnio dopiero około szóstej dekady życia, możemy domniemywać, że niewydolność układu odpornościowego może odgrywać w tej sytuacji znaczenie. [438]. Trudno jednak w całym układzie odporności wrodzonej i nabytej, z uwagi na mnogość interakcji między komórkami i stanami ich aktywacji, znaleźć jednego „winowajcę”. Rolę mogą tu odgrywać nieprawidłowości samych komórek (glejowych? leukocytów?) lub relacji między nimi (receptorów? cytokin? neurotrofin?).

Dowiedliśmy również związku pomiędzy płcią męską a wyższym poziomem białka w PMR chorych z ALS, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami [439].

6. OGRANICZENIA PRACY

Należy zaznaczyć, że grupy badana i kontrolna różniły się istotnie pod względem wieku, co mogło mieć wpływ na wyniki uzyskane przy porównywaniu grup.

Pozostawało to jednak bez znaczenia podczas analizowania zależności między parametrami krwi obwodowej, a płynu mózgowo-rdzeniowego, co było głównym celem niniejszej pracy.

Grupa badana, składająca się z 45 pacjentów, może się wydawać grupą nieliczną. Jednakże, z uwagi na rzadkość występowania tej jednostki chorobowej i krótkie przeżycie chorych, w dostępnym piśmiennictwie często spotyka się próby tej wielkości, dla schorzenia, jakim jest ALS.

Istotne znaczenie wydają się mieć również ograniczenia metodyczne. Z uwagi na wykorzystanie metody immunofluorescencyjnej badania, nie udało się oznaczyć neurotrofyny-4 (zbyt duże podobieństwo do analizowanej przez nas NT-3), a wyniki dla TNF α i NGF-beta okazały się poniżej poziomu oznaczalności. W kolejnych pracach do rozważenia byłoby wykorzystanie dokładniejszych metod immunoenzymatycznych.

7. WNIOSKI

1. Nie istnieje zależność pomiędzy stężeniem markerów zapalnych krwi obwodowej a stężeniem wybranych neurotrofin płynu mózgowo-rdzeniowego i stężeniem białka C-reaktywnego płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów ze sporadyczną postacią stwardnienia zanikowego bocznego. Najbardziej obiecującymi substancjami badanymi w płynie mózgowo-rdzeniowym, mogącymi być odpowiedzią na toczący się stan zapalny, okazała się neurotrofina 3 oraz CRP.

2. U chorych ze stwardnieniem zanikowym bocznym wyższe stężenie TNFR-1 w płynie mózgowo-rdzeniowym było związane z większym nasileniem choroby, co może czynić TNFR-1 potencjalnym markerem prognostycznym ALS.

8. STRESZCZENIE

Stwardnienie boczne zanikowe (ALS) jest postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym należącym do grupy chorób neuronu ruchowego. W jego przebiegu dochodzi do stopniowej utraty siły mięśniowej, co w ciągu kilku lat doprowadza do niepełnosprawności i śmierci pacjentów. Mimo wielu badań ALS nadal pozostaje schorzeniem o niejednoznacznej etiologii i patogenezie, co pozostaje w związku z brakiem możliwości skutecznej terapii i wynikającym z tego niekorzystnym rokowaniem. Dotychczasowe piśmiennictwo zdaje się potwierdzać znaczącą rolę układu immunologicznego w patofizjologii ALS, a nawet sugerować, że początek procesu chorobowego może mieć miejsce poza OUN i mieć związek ze stanem zapalnym i aktywacją nieswoistego układu odpornościowego. Istotą tego badania była próba powiązania stanu zapalnego obwodowego i lokalnego w OUN oraz wybrania czynnika mogącego służyć jako marker diagnostyczny choroby.

Celem niniejszej pracy było: określenie, czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem markerów zapalnych krwi obwodowej a stężeniem wybranych neurotrofin i stężeniem białka C-reaktywnego płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów ze sporadyczną postacią stwardnienia zanikowego bocznego, dokonanie porównania tych parametrów pomiędzy grupą badaną i kontrolną, a także określenie wpływu stężenia badanych czynników na obraz kliniczny choroby.

Badanie przeprowadzono na grupie 45 pacjentów z rozpoznaniem sporadycznej postaci ALS oraz 30 osobach zdrowych. Każdorazowo zebrano wywiad, przeprowadzono badanie neurologiczne oraz oznaczono morfologię, CRP i fibrynogen we krwi oraz stężenie NGF, BDNF, NT-3, TNF α i TNFR-1 płynie mózgowo-rdzeniowym. U pacjentów z ALS dodatkowo oceniano odpowiednimi skalami stan funkcjonalny oraz jakość życia.

Po kilkuetapowej analizie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Nie istnieje zależność pomiędzy stężeniem markerów zapalnych krwi obwodowej a stężeniem wybranych neurotrofin płynu mózgowo-rdzeniowego i stężeniem białka C-reaktywnego płynu mózgowo-rdzeniowego u pacjentów ze sporadyczną postacią stwardnienia zanikowego bocznego. Najbardziej obiecującymi substancjami badanymi w płynie mózgowo-rdzeniowym, mogącymi być odpowiedzią na toczący się stan zapalny, okazała się neurotrofina 3 oraz CRP.
2. U chorych ze stwardnieniem zanikowym bocznym wyższe stężenie TNFR-1 w płynie mózgowo-rdzeniowym było związane z większym nasileniem choroby, co może czynić TNFR-1 potencjalnym markerem prognostycznym ALS.

Słowa kluczowe: stwardnienie boczne zanikowe - patogeneza, zapalenie ośrodkowego układu nerwowego, neurotrofiny

9. ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disorder, belonging to the group of motor neuron diseases. It results in a gradual loss of muscle strength, which leads to disability and death within a few years. Despite many studies, ALS still remains a condition of ambiguous etiology and pathogenesis, what is related to the lack of effective therapy and the resulting unfavorable prognosis. The existing literature seems to confirm the significant role of the immune system in the pathophysiology of ALS and even suggests that the onset of the disease may take place outside the CNS and be related to inflammation and activation of the non-specific immune system. The essence of this study was an attempt to link peripheral and local inflammation in the CNS and to select a factor that could serve as a diagnostic marker of the disease.

The aim of this study was: to determine whether there is a relationship between the concentration of inflammatory markers in peripheral blood and the concentration of selected neurotrophins and C-reactive protein in the cerebrospinal fluid in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis, to compare these parameters between the study and control group, and also to determine the influence of the concentration of tested factors on the clinical presentation of the disease.

The study was conducted on a group of 45 patients diagnosed with sporadic ALS and 30 healthy people. Each time, an interview was collected, a neurological examination was performed, and the blood count, CRP and fibrinogen in the blood serum, as well as the concentration of NGF, BDNF, NT-3, TNF α and TNFR-1 in the cerebrospinal fluid were determined. In ALS patients the functional status and quality of life were additionally assessed using appropriate scales.

After several steps of analysis of the obtained results, the following conclusions were formulated:

1. There is no relationship between the concentration of inflammatory markers in peripheral blood and the concentration of selected cerebrospinal fluid neurotrophins and the concentration of C-reactive protein in the cerebrospinal fluid in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. The most promising substances tested in the cerebrospinal fluid, which may be a response to the ongoing inflammation, turned out to be neurotrophin 3 and CRP.

2. In patients with amyotrophic lateral sclerosis a higher concentration of TNFR-1 in the cerebrospinal fluid was associated with a greater severity of the disease, which may make TNFR-1 a potential prognostic marker of ALS.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis - pathogenesis, inflammation of the central nervous system, neurotrophins

10. SPIS TABEL

Tabela 1. Kryteria rozpoznania ALS.

Tabela 2. Interpretacja zakresów punktacji dla wymiarów w ALSAQ-40.

Tabela 3. Liczba kobiet i mężczyzn w badanych grupach.

Tabela 4. Porównanie wieku w badanych grupach.

Tabela 5. Porównanie wyników uzyskanych z krwi w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela 6. Porównanie wyników uzyskanych z płynu mózgowo-rdzeniowego w grupie badanej i kontrolnej.

11. SPIS RYCIN

Rycina 1. Typy aktywacji mikrogleju.

Rycina 2. Zasada przygotowania analitu do fluorymetru Luminex.

Rycina 3. Graficzny rozkład postaci ALS w grupie badanej.

Rycina 4. Graficzny rozkład wyników w skali ALSAQ-40.

Rycina 5. Porównanie stężenia BDNF w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.

Rycina 6. Porównanie stężenia NT-3 w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.

Rycina 7. Porównanie stężenia CRP w PMR w grupach zależnie od wartości CRP w osoczu.

Rycina 8. Porównanie stężenia BDNF w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogenu w osoczu.

Rycina 9. Porównanie stężenia NT-3 w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogenu w osoczu.

Rycina 10. Porównanie stężenia CRP w PMR w grupach zależnie od wartości fibrynogenu w osoczu.

Rycina 11. Korelacja pomiędzy liczbą leukocytów we krwi a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

Rycina 12. Korelacja pomiędzy liczbą neutrofilów we krwi a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

Rycina 13. Korelacja pomiędzy wartościami NLR a stężeniem CRP w PMR w grupie badanej.

Rycina 14. Korelacja pomiędzy stężeniem CRP w osoczu a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

Rycina 15. Korelacja pomiędzy stężeniem CRP w osoczu a stężeniem CRP w PMR w grupie badanej.

Rycina 16. Korelacja pomiędzy stężeniem fibrynogenu w osoczu a stężeniem NT-3 w PMR w grupie badanej.

Rycina 17. Porównanie stężenia TNFR-1 w PMR w grupach zależnie od wieku.

Rycina 18. Porównanie stężenia białka w PMR w grupach zależnie od płci.

Rycina 19. Porównanie stężenia białka w PMR w grupach zależnie od codziennego funkcjonowania (ALSFRS).

Rycina 20. Porównanie stężenia TNFR-1 w PMR w grupach zależnie od nasilenia choroby (skala Norrisa).

12. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1

Skala ALSFRS-R (na podstawie [12] - opracowanie wersji w j. polskim - prof. dr hab. n. med. M. Kuźma-Kozakiewicz, Warszawski Uniwersytet Medyczny).

MOWA

4. Prawidłowa mowa
3. Wykrywalne zaburzenia mowy
2. Konieczność powtarzania
1. Mowa połączona z komunikacją niewerbalną
0. Brak użytecznej funkcji mowy

WYDZIELANIE ŚLINY

4. Prawidłowe
3. Nieznaczny, ale wyraźny nadmiar śliny w ustach; może występować nocny ślinotok
2. Umiarkowany nadmiar śliny; może występować minimalny ślinotok (w ciągu dnia)
1. Znaczący nadmiar śliny z niewielkim ślinotokiem
0. Znaczący ślinotok, konieczność stałego używania chusteczki higienicznej

POŁYKANIE

4. Zwyczajne nawyki żywieniowe
3. Wczesne problemy z jedzeniem – okresowe krztuszenie.
2. Zmiana stałości diety (unikanie niektórych pokarmów, rozdrabnianie)
1. Konieczność uzupełniającego dożywiania przez sondę.
0. Brak możliwości podawania pożywienia doustnie (wyłącznie podawanie pozajelitowe lub do jelitowe).

PISMO RĘCZNE

4. Prawidłowe
3. Powolne lub zmienione, ale wszystkie słowa są czytelne
2. Nie wszystkie słowa są czytelne
1. Może utrzymać długopis, ale nie może pisać
0. Nie jest w stanie utrzymać długopisu

KROJENIE JEDZENIA I UŻYWANIE SZTUĆCÓW (pacjenci bez gastrostomii; w przypadku korzystania z gastrostomii proszę przejść do „Czynności związane z obsługą gastrostomii”)

4. Prawidłowe
3. Nieco powolne i niezdarne, ale pomoc nie jest wymagana
2. Może pokroić większość pokarmów na talerzu (>50%), chociaż powoli i niezdarne; wymagana jest pewna pomoc
1. Pokarm musi być pokrojony przez kogoś, ale pacjent może nadal jeść powoli
0. Pacjent musi być karmiony

Czynności związane z obsługą gastrostomii (tylko pacjenci z gastrostomią)

4. Wykonuje sprawnie
3. Wykonuje z trudem, ale pacjent jest w stanie wykonywać niezależnie wszystkie manipulacje
2. Potrzebna pewna pomoc z otwarciem/zamknięciem
1. Zapewnia minimalną pomoc opiekunowi
0. Nie może wykonać żadnych elementów zadania

UBIERANIE I HIGIENA

4. Prawidłowa i samodzielna samoopieka
3. Niezależna i samodzielna samoopieka wymagająca wysiłku lub z obniżoną efektywnością
2. Konieczna okresowa pomoc lub metody zastępcze
1. Potrzebna pomoc przy samoopiece
0. Całkowita zależność

OBACANIE SIĘ W ŁÓŻKU I POPRAWIANIE POŚCIELI

4. Prawidłowe
3. Nieco powolne i niezdarne, ale pomoc nie jest wymagana
2. Może przewracać się samodzielnie i poprawić pościel, ale z dużą trudnością
1. Może rozpocząć, ale nie jest w stanie samodzielnie przewrócić się lub poprawić pościeli
0. Bezradny

CHODZENIE

4. Prawidłowe
3. Wczesne problemy z chodzeniem
2. Chodzi z pomocą (kuli/laski/kijków/pod rękę)
1. Porusza nogami, bez możliwości chodzenia
0. Brak celowego ruchu nóg

WCHODZENIE PO SCHODACH

4. Prawidłowe
3. Powolne
2. Niewielka niestabilność
1. Potrzebuje pomocy (poręczy lub osoby trzeciej)
0. Nie chodzi po schodach

DUSZNOŚĆ

4. Brak duszności/zadyszki
3. Występuje podczas chodzenia
2. Występuje podczas \geq jednej z następujących czynności: jedzenie, kąpiel, ubieranie się
1. Występuje w spoczynku: trudności w oddychaniu w pozycji siedzącej lub leżącej
0. Znaczące trudności: rozważane jest zastosowanie mechanicznej wentylacji

DUSZNOŚĆ SPOCZYNKOWA W POZYCJI LEŻĄCEJ

4. Brak
3. Pewne trudności ze snem w nocy z powodu duszności, nie używa zwykle więcej niż dwóch poduszek
2. Potrzebuje do zaśnięcia dodatkowych poduszek (więcej niż dwie)
1. Może spać wyłącznie w pozycji siedzącej
0. Nie może spać bez wentylacji mechanicznej

NIEWYDOLNOŚĆ ODDECHOWA

4. Brak
3. Okresowe stosowanie BiPAP
2. Ciągłe stosowanie BiPAP w nocy
1. Ciągłe stosowanie a BiPAP w dzień i w nocy
0. Inwazyjna wentylacja mechaniczna po zastosowaniu intubacji lub tracheostomii

Załącznik nr 2

Zmodyfikowana skala Norrisa (na podstawie [328]).

	Skala oceny	3 Prawidłowy	2 Osłabiony	1 Śladowy	0 Brak
1	Utrzymanie głowy				
2	Polykanie				
3	Mówienie				
4	Przewracanie się w łóżku				
5	Siadanie				
6	Oddychanie				
7	Kaszel				
8	Podpisywanie się				
9	Zapinanie się, zasuwanie zamka				
10	Ubieranie samodzielne koszuli, bluzki				
11	Ubieranie samodzielne spódnicy, spodni				
12	Samodzielne jedzenie				
13	Podnoszenie szklanki i picie				
14	Uchwycenie i podnoszenie				
15	Czesanie				
16	Czyszczenie zębów				
17	Podnoszenie książki lub teczki				
18	Podnoszenie widelca, ołówka				
19	Zmiana pozycji ramienia				
20	Wchodzenie po schodach				
21	Przechodzenie 100 m				
22	Przechodzenie po pokoju				
23	Chodzenie przy pomocy				
24	Wstawanie				
25	Zmiana pozycji nóg				
	Odruchy rozciągowe	Wygórowane	Osłabione	Nieobecne	Kloniczne
26	Kończyny górne				

27	Kończyny dolne				
	Odruch zuchwowy (skala)	Nieobecny	Obecny	Wygórowany	Kloniczny
28	Nasilenie				
	Odruch podeszwowy	Zgięciowy	Nieobecny	Wątpliwy	Wyprostny
29	Prawy				
30	Lewy				
	Skala oceny fascykulacji	Brak	Niewielkie	Średnie	Znaczne
31	Fascykulacje				
	Zaniki mięśni	3	2	1	0
		Prawidłowy	Oslabiony	Śladowy	
32	Twarz, język				
33	K. górne + ramię				
34	K. dolne + biodro				
35	Labilność emocjonalna				
36	Męczliwość				
37	Sztywność k. dolnych				
38	Sztywność k. górnych				
39	Kurcze				
40	Ból				
	SUMA:				

Załącznik nr 3

Kwestionariusz ALSAQ-40 (zmodyfikowano na podstawie [329]).

Uprzejmie proszę Pana/Panią o wypełnienie poniższego kwestionariusza najszybciej jak to możliwe. Jeżeli ma Pan/Pani jakieś kłopoty proszę poprosić o pomoc kogoś innego, pamiętając, że interesują nas tylko Pana/Pani odpowiedzi.

Kwestionariusz składa się z zagadnień dotyczących trudności, które napotkał Pan/Pani w ciągu ostatnich dwóch tygodni.

Nie ma dobrych ani złych odpowiedzi.

Pierwsza odpowiedź, która przyjdzie Panu/Pani do głowy, jest najprawdopodobniej tą właściwą. Proszę zaznaczyć wariant, który najlepiej opisuje Pana/Pani odczucia i doświadczenia. Proszę odpowiedzieć na wszystkie pytanie, nawet na te, które wydają się do siebie podobne lub może się wydawać, że Pana/Pani nie dotyczą. Wszystkie informacje, które Pan/Pani poda są ściśle poufne.

Jak często w ciągu ostatnich dwóch tygodni poniższe stwierdzenia były prawdziwe?

1. Było mi trudno przechodzić krótkie dystanse, np. wokół domu.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie mogę chodzić

2. Przewróciłem/am się podczas chodzenia.

- a) nigdy
- b) rzadko

- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

3. Potknąłem/am się podczas chodzenia.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

4. Straciłem/am równowagę podczas chodzenia.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

5. Muszę się koncentrować podczas chodzenia.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

6. Chodzenie męczyło (wyczerpywało) mnie.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem

- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

7. Miałem/am bóle nóg podczas chodzenia.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

8. Trudno jest mi wchodzić na schody i schodzić ze schodów.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie chodzę

9. Było mi trudno wstawać.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

10. Było mi trudno wstawać z fotela.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często

e) zawsze

11. Miałem/am trudności z używaniem rąk i dłoni.

a) nigdy

b) rzadko

c) czasem

d) często

e) zawsze

12. Było mi trudno przekręcać się w łóżku.

a) nigdy

b) rzadko

c) czasem

d) często

e) zawsze/nie przekręcę się w łóżku

13. Było mi trudno podnosić przedmioty.

a) nigdy

b) rzadko

c) czasem

d) często

e) zawsze

14. Sprawiało mi trudność trzymanie książek, gazet, przewracanie kartek.

a) nigdy

b) rzadko

c) czasem

d) często

e) zawsze / nie wykonam tych czynności

15. Miałem/am trudności w czytelnym pisaniu.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / piszę nieczytelnie

16. Miałem/am trudności z czynnościami domowymi.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

17. Miałem/am trudności z karmieniem siebie.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie potrafię nakarmić siebie

18. Miałem/am trudności z czesaniem się i myciem zębów.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

19. Miałem/am trudności z ubieraniem się.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie ubiorę się

20. Miałem/am trudności z myciem rąk.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie umyję rąk

21. Miałem/am trudności z przełykaniem.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / w trakcie jedzenia krztuszę się

22. Miałem/am trudności z jedzeniem stałych pokarmów.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze / nie jadam stałych posiłków

23. Miałem/am trudności z piciem.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

24. Miałem/am trudności z rozmową.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

25. Czułem/am, że moja mowa jest trudna do zrozumienia.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

26. Mówiłem/am niewyraźnie (bełkotliwie) albo jąkałem/am się.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

27. Musiałem/am mówić bardzo powoli.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

28. Mówiłem/am mniej niż zwykle.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

29. Czułem/am się sfrustrowany/a moją mową.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

30. Czułem/am się zażenowany (onieśmielony) moją mową.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

31. Czułem/am się samotny.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

32. Nudziłem/am się.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

33. Czułem/am się zażenowany (onieśmielony) w sytuacjach publicznych.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

34. Negatywnie postrzegałem/am swoją przyszłość.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

35. Martwiłem/am się, że jestem ciężarem dla innych.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

36. Zastanawiałem/am się dlaczego ja żyję.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

37. Czułem/am się zły z powodu choroby.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

38. Byłem/am smutny/a.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

39. Martwiłem/am się o to, jak ta choroba wpłynie na mnie w przyszłości.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

40. Czułem/am się jakbym nie był/a wolny/a.

- a) nigdy
- b) rzadko
- c) czasem
- d) często
- e) zawsze

13. PIŚMIENICTWO

1. Traub R., Mitsumoto H. Stwardnienie boczne zanikowe i choroby neuronu ruchowego. W: Merritt Neurologia tom 2 (red. E.D. Louis, S.A. Mayer, L.P. Rowland). Wyd. 13. Wrocław: Edra Urban & Partner, 2018. ISBN: 978-83-65625-94-6.
2. Stępień A. Choroby neuronu ruchowego. W: Stępień A. red. Neurologia tom 2. Warszawa: Medical Tribune Polska, 2014. s. 510-517. ISBN: 978-83-64153-00-6.
3. Brown R.H. Jr. Stwardnienie zanikowe boczne i inne choroby neuronu ruchowego. W: Harrison. Neurologia w medycynie klinicznej (red. S.L. Hauser). Lublin: Wyd. Czelej Sp. z o.o., 2008. ISBN: 978-83-60608-44-9.
4. Charcot J.M. De la sclérose latérale amyotrophique. Prog Med. 1874;2:325–327.
5. Kjældgaard A.L., Pilely K., Olsen K.S., Pedersen S.W., Lauritsen A.Ø., Møller K., Garred P. Amyotrophic lateral sclerosis: The complement and inflammatory hypothesis. Mol Immunol. 2018;102:14-25. doi: 10.1016/j.molimm.2018.06.007.
6. Hu Y., Cao C., Qin X.Y., Yu Y., Yuan J., Zhao Y., Cheng Y. Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. Sci Rep. 2017;7(1):9094. doi: 10.1038/s41598-017-09097-1.
7. Goetz C.G. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. Muscle Nerve. 2000;23:336–343. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(200003)23:3<336::aid-mus4>3.0.co;2-1.
8. Chio A., Logroscino G., Hardiman O., Swingler R., Mitchell D., Beghi E., Traynor B.G. Prognostic factors in ALS: a critical review. Amyotroph Lateral Scler. 2009;10:310–323. doi: 10.3109/17482960802566824.
9. Miller T.M., Cudkowicz M.E., Genge A., Shaw P.J., Sobue G., Bucelli R.C., Chiò A., Van Damme P., Ludolph A.C., Glass J.D., Andrews J.A., Babu S., Benatar M., McDermott C.J., Cochrane T., Chary S., Chew S., Zhu H., Wu F., Nestorov I.,

- Graham D., Sun P., McNeill M., Fanning L., Ferguson T.A., Fradette S., VALOR and OLE Working Group. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med.* 2022;387(12):1099-1110. doi: 10.1056/NEJMoa2204705.
10. Masrori P., Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol.* 2020;27(10):1918-1929. doi: 10.1111/ene.14393.
11. Piro E.P. Review of Dextromethorphan 20 mg/Quinidine 10 mg (NUEDEXTA®) for Pseudobulbar Affect. *Neurol Ther.* 2014;3(1):15-28. doi: 10.1007/s40120-014-0018-5.
12. Cedarbaum J.M., Stambler N., Malta E., Fuller C., Hilt D., Thurmond B., Nakani-shi A. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci.* 1999;169(1-2):13-21. doi: 10.1016/s0022-510x(99)00210-5.
13. Feldman E.L., Goutman S.A., Petri S., Mazzini L., Savelieff M.G., Shaw P.J., Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet.* 2022;400(10360):1363-1380. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01272-7.
14. Chakraborty A., Diwan A. Biomarkers and molecular mechanisms of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *AIMS Neurosci.* 2022;9(4):423-443. doi: 10.3934/Neuroscience.2022023.
15. Paganoni S., Watkins C., Cawson M., Hendrix S., Dickson S.P., Knowlton N., Timmons J., Manuel M., Cudkowicz M. Survival analyses from the CENTAUR trial in amyotrophic lateral sclerosis: Evaluating the impact of treatment crossover on outcomes. *Muscle Nerve.* 2022;66(2):136-141. doi: 10.1002/mus.27569.
16. Ketabforoush A.H.M.E., Chegini R., Barati S., Tahmasebi F., Moghisseh B., Joghataei M.T., Faghihi F., Azedi F. Masitinib: The promising actor in the next

- season of the Amyotrophic Lateral Sclerosis treatment series. *Biomed Pharmacother.* 2023;160:114378. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114378.
17. Vu L.T., Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2017;14:119-134. doi: 10.1007/s13311-016-0503-x.
18. Youngson R.M. *Collins Dictionary of Medicine.* Wyd. 4. Glasgow: Collins, 2005. ISBN: 978-0007800810.
19. Keizman D., Rogowski O., Berliner S., Ish-Shalom M., Maimon N., Nefussy B., Artamonov I., Drory V.E.. Low-grade systemic inflammation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2009;119(6):383-9. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01112.x.
20. Rodríguez M., Mahy N. Neuron-Microglia interactions in motor neuron degeneration. The inflammatory hypothesis in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *Curr Med Chem.* 2016;23:4753–4772. doi: 10.2174/0929867324666161123091314.
21. Gille B., De Schaepdryver M., Dedeene L., Goossens J., Claeys K., Van Den Bosch L., Tournoy J., Van Damme P., Poesen K. Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(12):1338-1346. doi: 10.1136/jnnp-2018-319586.
22. Lunetta C., Lizio A., Maestri E., Sansone V.A., Mora G., Miller R.G., Appel S.H., Chiò A. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2017;74(6):660-667. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.6179.
23. Ekester E. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2004;1(2-3):88-100. doi: 10.1159/000080049.

24. Grundstrom E., Lindholm D., Johansson A., Blennow K., Askmark H. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 2000;11:1781–1783. doi: 10.1097/00001756-200006050-00037.
25. Manabe Y., Nagano I., Gazi M.S., Murakami T., Shiote M., Shoji M., Kitagawa H., Abe K. Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 2003;25(2):195-200. doi: 10.1179/016164103101201193.
26. Mitchell R.M., Freeman W.M., Randazzo W.T., Stephens H.E., Beard J.L., Simmons Z., Connor J.R. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2009;72(1):14-19. doi: 10.1212/01.wnl.0000333251.36681.a5.
27. Blasco H., Garcon G., Patin F., Veyrat-Durebex C., Boyer J., Devos D., Vourc'h P., Andres C.R., Corcia P. Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Can J Neurol Sci*. 2017;44(1):90-95. doi: 10.1017/cjn.2016.284.
28. Murdock B.J., Bender D.E., Kashlan S.R., Figueroa-Romero C., Backus C., Callaghan B.C., Goutman S.A., Feldman E.L. Increased ratio of circulating neutrophils to monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(4):e242. doi: 10.1212/NXI.0000000000000242.
29. Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):385-90. doi: 10.1136/jnnp.2009.183525.

30. Zufiría M., Gil-Bea F. J., Fernández-Torrón R., Poza J. J., Muñoz-Blanco J. L. Rojas-García R. Riancho J., López de Munain, A. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol.* 2016;142:104-129. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.05.004.
31. Cronin S., Hardiman O., Traynor B.J. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology.* 2007;68:1002–1007. doi: 10.1212/01.wnl.0000258551.96893.6f.
32. Shaw C.E., Al-Chalabi A., Leigh N. Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001;1(1):69-76. doi: 10.1007/s11910-001-0078-7.
33. Chia R., Chiò A., Traynor, B. J. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol.* 2018;17(1):94–102. doi: 10.1016/s1474-4422(17)30401-5.
34. Tokuda E., Furukawa Y. Copper Homeostasis as a Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):636. doi: 10.3390/ijms17050636.
35. Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis, Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1:293-299, doi: 10.1080/146608200300079536.
36. Al-Chalabi A., Hardiman O., Kiernan M.C., Chiò A., Rix-Brooks B., van den Berg L.H. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol.* 2016;15(11):1182-94. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30199-5.

37. Costa J., Swash M., de Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol.* 2012;69(11):1410-6. doi: 10.1001/archneurol.2012.254.
38. Schrooten M., Smetcoren C., Robberecht W., Van Damme P. Benefit of the Awaji diagnostic algorithm for amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *Ann Neurol.* 2011;70(1):79-83. doi: 10.1002/ana.22380.
39. Gawel M., Kuzma-Kozakiewicz M., Szmidt-Salkowska E., Kamińska A. Are we really closer to improving the diagnostic sensitivity in ALS patients with Awaji criteria? *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15(3-4):257-61. doi: 10.3109/21678421.2014.887118.
40. Agosta F., Al-Chalabi A., Filippi M., Hardiman O., Kaji R., Meininger V., Nakano I., Shaw P., Shefner J., van den Berg L.H., Ludolph A.: WFN Research Group on ALS/MND. The El Escorial criteria: strengths and weaknesses. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015;16(1-2):1-7. doi: 10.3109/21678421.2014.964258.
41. van Es M.A., Hardiman O., Chio A., Al-Chalabi A., Pasterkamp R.J., Veldink J.H., van den Berg L.H., Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet.* 2017;390(10107):2084-2098. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31287-4.
42. de Jongh A.D., Braun N., Weber M., van Es M.A., Masrori P., Veldink J.H., van Damme P., van den Berg L.H., van Eijk R.P.A. Characterising ALS disease progression according to El Escorial and Gold Coast criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022;93(8):865-870. doi: 10.1136/jnnp-2022-328823.
43. Nguyen H.P., Van Broeckhoven C., van der Zee J. ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends Genet* 2018;34(6):404–423. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.001.

44. O'Brien M., Burke T., Heverin M., Vajda A., McLaughlin R., Gibbons J., Byrne S., Pinto-Grau M., Elamin M., Pender N., Hardiman O. Clustering of Neuropsychiatric Disease in First-Degree and Second-Degree Relatives of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2017;74(12):1425-1430. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.2699.
45. McLaughlin R.L., Schijven D., van Rheenen W., van Eijk K.R., O'Brien M., Kahn R.S., Ophoff R.A., Goris A., Bradley D.G., Al-Chalabi A., van den Berg L.H., Luykx J.J., Hardiman O., Veldink J.H. Project MinE GWAS Consortium; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic correlation between amyotrophic lateral sclerosis and schizophrenia. *Nat Commun.* 2017;8:14774. doi: 10.1038/ncomms14774.
46. Pinto W.B.V.R., Debona R., Nunes P.P., Assis A.C.D., Lopes C.G., Bortholin T., Dias R.B., Naylor F.G.M., Chieia M.A.T., Souza P.V.S., Oliveira A.S.B. Atypical Motor Neuron Disease variants: Still a diagnostic challenge in Neurology. *Rev Neurol (Paris).* 2019;175(4):221-232. doi: 10.1016/j.neurol.2018.04.016.
47. Yedavalli V.S., Patil A., Shah P. Amyotrophic Lateral Sclerosis and its Mimics/Variants: A Comprehensive Review. *J Clin Imaging Sci.* 2018;8:53. doi: 10.4103/jcis.JCIS_40_18.
48. Al-Chalabi A., Calvo A., Chio A., Colville S., Ellis C.M., Hardiman O., Heverin M., Howard R.S., Huisman M.H.B., Keren N., Leigh P.N., Mazzini L., Mora G., Orrell R.W., Rooney J., Scott K.M., Scotton W.J., Seelen M., Shaw C.E., Sidle K.S., Swingler R., Tsuda M., Veldink J.H., Visser A.E., van den Berg L.H., Pearce N. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 1108–1113. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70219-4.

49. Goutman S.A., Hardiman O., Al-Chalabi A., Chió A., Savelieff M.G., Kiernan M.C., Feldman E.L. Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2022;21(5):465-479. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00414-2.
50. Al-Chalabi A., Fang F., Hanby M.F., Leigh P.N., Shaw C.E., Ye W., Rijsdijk F. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:1324–1326. doi: 10.1136/jnnp.2010.207464.
51. Gibson S.B., Figueroa K.P., Bromberg M.B., Pulst S.M., Cannon-Albright L. Familial clustering of ALS in a population-based resource. *Neurology.* 2014;82(1):17-22. doi: 10.1212/01.wnl.0000438219.39061.da.
52. Cooper-Knock J., Shaw P.J., Kirby J. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol.* 2014;127:333-345. doi: 10.1007/s00401-014-1251-9.
53. Millecamps S., Boillee S., Le Ber I., Seilhean D., Teyssou E., Giraudeau M., Moigneu C., Vandenberghe N., Danel-Brunaud V., Corcia P., Pradat P.F., Le Forestier N., Lacomblez L., Bruneteau G., Camu W. Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet.* 2012;49(4):258–263. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100699.
54. Beck J., Poulter M., Hensman D., Rohrer J.D., Mahoney C.J., Adamson G., Campbell T., Uphill J., Borg A., Fratta P., Orrell R.W., Malaspina A., Rowe J., Brown J., Hodges J. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in

- multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):345–353.
doi:10.1016/j.ajhg.2013.01.011.
55. Galimberti D., Arosio B., Fenoglio C., Serpente M., Cioffi S.M., Bonsi R., Rossi P., Abbate C., Mari D., Scarpini E. Incomplete Penetrance of the C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansions: frequency in a Cohort of Geriatric Non-Demented Subjects. *J Alzheimers Dis.* 2014;39(1):19-22. doi: 10.3233/JAD-131172.
56. Gendron T.F., Bieniek K.F., Zhang Y.J., Jansen-West K., Ash P.E., Caulfield T., Daugherty L., Dunmore J.H., Castanedes-Casey M., Chew J., Cosio D.M., van Blitterswijk M., Lee W.C., Rademakers R., Boylan K.B., Dickson D.W., Petrucelli L. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):829-44. doi: 10.1007/s00401-013-1192-8.
57. Ash P.E., Bieniek K.F., Gendron T.F., Caulfield T., Lin W.L., Dejesus-Hernandez M., van Blitterswijk M.M., Jansen-West K., Paul J.W. 3rd, Rademakers R., Boylan K.B., Dickson D.W., Petrucelli L. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron.* 2013;77(4):639-46. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.004.
58. Farg M.A., Sundaramoorthy V., Sultana J.M., Yang S., Atkinson R.A., Levina V., Halloran M.A., Gleeson P.A., Blair I.P., Soo K.Y., King A.E., Atkin J.D. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet.* 2014;23(13):3579-95. doi: 10.1093/hmg/ddu068.

59. Donnelly C.J., Zhang P.W., Pham J.T., Haeusler A.R., Mistry N.A., Vidensky S., Daley E.L., Poth E.M., Hoover B., Fines D.M., Maragakis N., Tienari P.J., Petrucelli L., Traynor B.J., Wang J., Rigo F., Bennett C.F., Blackshaw S., Sattler R., Rothstein J.D. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*. 2013;80(2):415-28. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.015.
60. O'Rourke J.G., Bogdanik L., Yáñez A., Lall D., Wolf A.J., Muhammad A.K., Ho R., Carmona S., Vit J.P., Zarrow J., Kim K.J., Bell S., Harms M.B., Miller T.M., Dangler C.A., Underhill D.M., Goodridge H.S., Lutz C.M., Baloh R.H.. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*. 2016;351(6279):1324-9. doi: 10.1126/science.aaf1064.
61. Atanasio A., Decman V., White D., Ramos M., Ikiz B., Lee H.C., Siao C.J., Brydges S., LaRosa E., Bai Y., Fury W., Burfeind P., Zamfirova R., Warshaw G., Orenge J., Oyejide A., Fralish M., Auerbach W., Poueymirou W., Freudenberg J., Gong G., Zambrowicz B., Valenzuela D., Yancopoulos G., Murphy A., Thurston G., Lai K.M. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep*. 2016;6:23204. doi: 10.1038/srep23204.
62. Cooper-Knock J., Higginbottom A., Stopford M.J., Highley J.R., Ince P.G., Wharton S.B., Pickering-Brown S., Kirby J., Hautbergue G.M., Shaw P.J. Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol*. 2015;130:63-75. doi: 10.1007/s00401-015-1429-9.

63. Burk K., Pasterkamp R.J. Disrupted Neuronal Trafficking in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2019;137:859–877. doi: 10.1007/s00401-019-01964-7.
64. Proctor E.A., Mowrey D.D., Dokholyan N.V. β -Methylamino-L-alanine substitution of serine in SOD1 suggests a direct role in ALS etiology. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(7):e1007225. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007225.
65. Proctor E.A., Fee L., Tao Y., Redler R.L., Fay J.M., Zhang Y., Lv Z., Mercer I.P., Deshmukh M., Lyubchenko Y.L., Dokholyan N.V. Nonnative SOD1 trimer is toxic to motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(3):614-9. doi: 10.1073/pnas.1516725113.
66. Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K., Kowall N.W., Ferrante R.J., Siwek D.F., Wilcox H.M., Flood D.G., Beal M.F., Brown R.H. Jr, Scott R.W., Snider W.D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 1996;13(1):43-7. doi: 10.1038/ng0596-43.
67. Kostrominova T.Y. Advanced age-related denervation and fiber-type grouping in skeletal muscle of SOD1 knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(10):1582-93. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.022.
68. Robberecht W., Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:248-264. doi: 10.1038/nrn3430.
69. Munch, C., O'Brien J. & Bertolotti A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:3548–3553. doi: 10.1073/pnas.1017275108.
70. Ayers J. I., Fromholt S.E., O'Neal V.M., Diamond J.H., Borchelt D.R. Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread

- along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol.* 2016;131:103-114. doi: 10.1007/s00401-015-1514-0.
71. Puentes F., Malaspina A., van Noort J.M., Amor S. Non-neuronal Cells in ALS: Role of Glial, Immune cells and Blood-CNS Barriers. *Brain Pathol.* 2016;26(2):248-57. doi: 10.1111/bpa.12352.
72. Heneka M.T., Kummer M.P., Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:463–477. doi: 10.1038/nri3705.
73. Bosco D.A., Morfini G., Karabacak N.M., Song Y., Gros-Louis F., Pasinelli P., Goolsby H., Fontaine B.A., Lemay N., McKenna-Yasek D., Frosch M.P., Agar J.N., Julien J.P., Brady S.T., Brown R.H. Jr. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci.* 2010;13(11):1396-403. doi: 10.1038/nn.2660.
74. Ezzi S.A., Urushitani M., Julien J.P. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem.* 2007;102:170-178. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04531.x.
75. Wang I.F., Wu L.S., Shen C.K.. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 2008;14(11):479-85. doi: 10.1016/j.molmed.2008.09.001.
76. Ling J.P., Pletnikova O., Troncoso J.C., Wong P.C.. TDP-43 repression of non-conserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science.* 2015;349(6248):650-5. doi: 10.1126/science.aab0983.
77. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H.A.,

- Trojanowski J.Q., Lee V.M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3. doi: 10.1126/science.1134108.
78. Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P., Spiegelman D., McConkey B.J., Vande Velde C., Bouchard J.P., Lacomblez L., Pochigava K., Salachas F., Pradat P.F., Camu W., Meininger V., Dupre N., Rouleau G.A.. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008;40(5):572-4. doi: 10.1038/ng.132.
79. Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Hutt K.R., Vu A.Q., Baughn M., Huelga S.C., Clutario K.M., Ling S.C., Liang T.Y., Mazur C., Wancewicz E., Kim A.S., Watt A., Freier S., Hicks G.G., Donohue J.P., Shiue L., Bennett C.F., Ravits J., Cleveland D.W., Yeo G.W. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat Neurosci*. 2012;15(11):1488-97. doi: 10.1038/nn.3230.
80. Kwiatkowski T.J. Jr, Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vanderburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G.A., Hosler B.A., Cortelli P., de Jong P.J., Yoshinaga Y., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P.C., Horvitz H.R., Landers J.E., Brown R.H. Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009;323(5918):1205-8. doi: 10.1126/science.1166066.
81. Vance C., Rogelj B., Hortobágyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., Ganesalingam J., Williams K.L., Tripathi V., Al-Saraj S., Al-Chalabi A., Leigh P.N., Blair I.P., Nicholson G., de Bellerocche J., Gallo J.M., Miller C.C., Shaw C.E.. Mutations in FUS, an RNA processing

- protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009;323(5918):1208-1211. doi: 10.1126/science.1165942.
82. Wang T., Jiang X., Chen G., Xu J. Interaction of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration-associated fused-in-sarcoma with proteins involved in metabolic and protein degradation pathways. *Neurobiol Aging*. 2015;36(1):527-35. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.044.
83. Bäumer D., Hilton D., Paine S.M., Turner M.R., Lowe J., Talbot K., Ansorge O. Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations. *Neurology*. 2010;75(7):611-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ed9cde.
84. King O.D., Gitler A.D., Shorter J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res*. 2012;1462:61-80. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.016.
85. Arnold E.S., Ling S.C., Huelga S.C., Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Ditsworth D., Kordasiewicz H.B., McAlonis-Downes M., Platoshyn O., Parone P.A., Da Cruz S., Clutario K.M., Swing D., Tessarollo L., Marsala M., Shaw C.E., Yeo G.W., Cleveland D.W. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(8):E736-45. doi: 10.1073/pnas.1222809110.
86. Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K.R., Huelga S.C., Moran J., Liang T.Y., Ling S.C., Sun E., Wancewicz E., Mazur C., Kordasiewicz H., Sedaghat Y., Donohue J.P., Shiue L., Bennett C.F., Yeo G.W., Cleveland D.W. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):459-68. doi: 10.1038/nn.2779.

87. Merjane J., Chung R., Patani R., Lisowski L. Molecular mechanisms of amyotrophic lateral sclerosis as broad therapeutic targets for gene therapy applications utilizing adeno-associated viral vectors. *Med Res Rev.* 2023;43(4):829-854. doi: 10.1002/med.21937.
88. Williams K.L., Topp S., Yang S., Smith B., Fifita J.A., Warraich S.T., Zhang K.Y., Farrarwell N., Vance C., Hu X., Chesi A., Leblond C.S., Lee A., Rayner S.L., Sundaramoorthy V., Dobson-Stone C., Molloy M.P., van Blitterswijk M., Dickson D.W., Petersen R.C., Graff-Radford N.R., Boeve B.F., Murray M.E., Potier C., Don E., Winnick C., McCann E.P., Hogan A., Daoud H., Levert A., Dion P.A., Mitsui J., Ishiura H., Takahashi Y., Goto J., Kost J., Gellera C., Gkazi A.S., Miller J., Stockton J., Brooks W.S., Boundy K., Polak M., Muñoz-Blanco J.L., Esteban-Pérez J., Rábano A., Hardiman O., Morrison K.E., Ticozzi N., Silani V., de Belleruche J., Glass J.D., Kwok J.B., Guillemin G.J., Chung R.S., Tsuji S., Brown R.H. Jr, García-Redondo A., Rademakers R., Landers J.E., Gitler A.D., Rouleau G.A., Cole N.J., Yerbury J.J., Atkin J.D., Shaw C.E., Nicholson G.A., Blair I.P. C9orf72 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat Commun.* 2016;7:11253. doi: 10.1038/ncomms11253.
89. Mehta P., Kaye W., Raymond J., Wu R., Larson T., Punjani R., Heller D., Cohen J., Peters T., Muravov O., Horton K. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis - United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67(7):216-218. doi: 10.15585/mmwr.mm6707a3.
90. Goutman S.A., Hardiman O., Al-Chalabi A., Chió A., Savelieff M.G., Kiernan M.C., Feldman E.L. Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2022;21(5):480-493. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00465-8.

91. Hardiman O., Al-Chalabi A., Chio A., Corr E.M., Logroscino G., Robberecht W., Shaw P.J., Simmons Z., van den Berg L.H. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17071. doi: 10.1038/nrdp.2017.71.
92. Barmada S.J., Skibinski G., Korb E., Rao E.J., Wu J.Y., Finkbeiner S. Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2010;30(2):639-649. doi:10.1523/jneurosci.4988-09.2010.
93. Pozzi S., Thammisetty S.S., Codron P., Rahimian R., Plourde K.V., Soucy G., Baireil C., Phaneuf D., Kriz J., Gravel C., Julien J.P. Virus-mediated delivery of antibody targeting TAR DNA-binding protein-43 mitigates associated neuropathology. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1581-1595. doi: 10.1172/JCI123931.
94. Kanekura K., Kuroda M. How can we interpret the relationship between liquid-liquid phase separation and amyotrophic lateral sclerosis? *Lab Invest*. 2022;102(9):912-918. doi: 10.1038/s41374-022-00791-x.
95. Scotter E.L., Vance C., Nishimura A.L., Lee Y.B., Chen H.J., Urwin H., Sardone V., Mitchell J.C., Rogelj B., Rubinsztein D.C., Shaw C.E. Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J Cell Sci*. 2014;127(6):1263-78. doi: 10.1242/jcs.140087.
96. Shin Y., Brangwynne C.P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017;357(6357):eaaf4382. doi:10.1126/science.aaf4382.
97. Vanselow B.K., Keller B.U. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurons from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol*. 2000;525(2):433-45. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00433.x.

98. Smittkamp S.E., Morris J.K., Bomhoff G.L., Chertoff M.E., Geiger P.C., Stanford J.A. SOD1-G93A mice exhibit muscle-fiber-type-specific decreases in glucose uptake in the absence of whole-body changes in metabolism. *Neurodegener Dis.* 2014;13(1):29-37. doi: 10.1159/000351606.
99. Wang L., Jiang Z., Lei X.G. Knockout of SOD1 alters murine hepatic glycolysis, gluconeogenesis, and lipogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(9):1689-96. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.570.
100. Fergani A., Eschbach J., Oudart H., Larmet Y., Schwalenstocker B., Ludolph A.C., Loeffler J.P., Dupuis L. A mutation in the dynein heavy chain gene compensates for energy deficit of mutant SOD1 mice and increases potentially neuroprotective IGF-1. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):26. doi: 10.1186/1750-1326-6-26.
101. Stallings N.R., Puttaparthi K., Dowling K.J., Luther C.M., Burns D.K., Davis K., Elliott J.L. TDP-43, an ALS linked protein, regulates fat deposition and glucose homeostasis. *PLoS One.* 2013;8(8):e71793. doi: 10.1371/journal.pone.0071793.
102. Chiang P.M., Ling J., Jeong Y.H., Price D.L., Aja S.M., Wong P.C. Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(37):16320-4. doi: 10.1073/pnas.1002176107.
103. Hargett S.R., Walker N.N., Hussain S.S., Hoehn K.L., Keller S.R. Deletion of the Rab GAP *Tbc1d1* modifies glucose, lipid, and energy homeostasis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(3):E233-45. doi: 10.1152/ajpendo.00007.2015.
104. Cistaro A., Pagani M., Montuschi A., Calvo A., Moglia C., Canosa A., Restagno G., Brunetti M., Traynor B.J., Nobili F., Carrara G., Fania P., Lopiano L., Valentini M.C., Chiò A. The metabolic signature of C9ORF72-related ALS: FDG PET

- comparison with nonmutated patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(5):844-52. doi: 10.1007/s00259-013-2667-5.
105. Dupuis L., Corcia P., Fergani A., Gonzalez De Aguilar J.L., Bonnefont-Rousselot D., Bittar R., Seilhean D., Hauw J.J., Lacomblez L., Loeffler J.P., Meininger V. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008;70(13):1004-9. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.
106. Philips T., Rothstein J.D. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2014;262 Pt B:111-20. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.015.
107. Beers D.R., Appel S.H. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *Lancet Neurol*. 2019;18(2):211-220. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30394-6.
108. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8. doi: 10.1126/science.1110647.
109. Schafer D.P., Lehrman E.K., Stevens B. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*. 2013;61(1):24-36. doi: 10.1002/glia.22389.
110. Tateishi T., Yamasaki R., Tanaka M., Matsushita T., Kikuchi H., Isobe N., Ohyagi Y., Kira J. CSF chemokine alterations related to the clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;222(1-2):76-81. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.004.
111. Lu C.H., Allen K., Oei F., Leoni E., Kuhle J., Tree T., Fratta P., Sharma N., Siddle K., Howard R., Orrell R., Fish M., Greensmith L., Pearce N., Gallo V., Malaspina A. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in

- amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(4):e244. doi: 10.1212/NXI.0000000000000244.
112. Hooten K.G., Beers D.R., Zhao W., Appel S.H. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2015;12(2):364-75. doi: 10.1007/s13311-014-0329-3.
113. Al-Chalabi A., Andersen P.M., Nilsson P., Chioza B., Andersson J.L., Russ C., Shaw C.E., Powell J.F., Leigh P.N.. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 1999;8(2):157-64. doi: 10.1093/hmg/8.2.157.
114. Marinkovic P., Reuter M.S., Brill M.S., Godinho L., Kerschensteiner M., Miggeld T. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(11):4296-301. doi: 10.1073/pnas.1200658109.
115. Bergeron C., Beric-Maskarel K., Muntasser S., Weyer L., Somerville M.J., Percy M.E. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(3):221-30. doi: 10.1097/00005072-199405000-00002.
116. Figlewicz D.A., Krizus A., Martinoli M.G., Meininger V., Dib M., Rouleau G.A., Julien J.P. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 1994;3(10):1757-61. doi: 10.1093/hmg/3.10.1757.
117. Storkebaum E., Lambrechts D., Dewerchin M., Moreno-Murciano M.P., Appelmans S., Oh H., Van Damme P., Rutten B., Man W.Y., De Mol M., Wyns S., Manka D., Vermeulen K., Van Den Bosch L., Mertens N., Schmitz C., Rob-

- berecht W., Conway E.M., Collen D., Moons L., Carmeliet P. Treatment of motor neuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci.* 2005;8(1):85-92. doi: 10.1038/nn1360.
118. Tu W.Y., Xu W., Zhang J., Qi S., Bai L., Shen C., Zhang K. C9orf72 poly-GA proteins impair neuromuscular transmission. *Zool Res.* 2023;44(2):331-340. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.356.
119. Manfredi G., Xu Z. Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion.* 2005;5(2):77-87. doi: 10.1016/j.mito.2005.01.002.
120. Damiano M., Starkov A.A., Petri S., Kipiani K., Kiaei M., Mattiazzi M., Flint Beal M., Manfredi G. Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem.* 2006;96(5):1349-61. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03619.x.
121. Van Den Bosch L., Van Damme P., Bogaert E., Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(11-12):1068-82. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.05.002.
122. Magrané J., Manfredi G. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(7):1615-26. doi: 10.1089/ARS.2009.2604.
123. De Vos K.J., Chapman A.L., Tennant M.E., Manser C., Tudor E.L., Lau K.F., Brownlee J., Ackerley S., Shaw P.J., McLoughlin D.M., Shaw C.E., Leigh P.N., Miller C.C.J., Grierson A.J. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet.* 2007;16(22):2720-2728. doi: 10.1093/hmg/ddm226.

124. Sasaki S., Iwata M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 1996;47(2):535-40. doi: 10.1212/wnl.47.2.535.
125. Moumen R., Nouvelot A., Duval D., Lechevalier B., Viader F. Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1997;151(1):35-9. doi: 10.1016/s0022-510x(97)00109-3.
126. Jennewein C., Tran N., Paulus P., Ellinghaus P., Eble J.A., Zacharowski K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med*. 2011;17(5-6):568-73. doi: 10.2119/molmed.2010.00146.
127. Olmos G., Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.
128. Guidotti G., Scarlata C., Brambilla L., Rossi D. Tumor Necrosis Factor Alpha in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Friend or Foe? *Cells*. 2021;10(3):518. doi: 10.3390/cells10030518.
129. Lima Giacobbo B., Doorduyn J., Klein H.C., Dierckx R.A.J.O., Bromberg E., de Vries E.F.J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019;56(5):3295-3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
130. Philips T., Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol*. 2011;10(3):253-63. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70015-1.
131. Nakagawa Y., Chiba K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2015;154:21-35. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.06.010.

132. Hammond T.R., Dufort C., Dissing-Olesen L., Giera S., Young A., Wysoker A., Walker A.J., Gergits F., Segel M., Nemesh J., Marsh S.E., Saunders A., Macosko E., Ginhoux F., Chen J., Franklin R.J.M., Piao X., McCarroll S.A., Stevens B. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*. 2019;50(1):253-271.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004.
133. Sulimai N., Lominadze D. Fibrinogen and Neuroinflammation During Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2020;57(11):4692-4703. doi: 10.1007/s12035-020-02012-2.
134. Paolicelli R.C., Sierra A., Stevens B., Tremblay M.E., Aguzzi A., Ajami B., Amit I., Audinat E., Bechmann I., Bennett M., Bennett F., Bessis A., Biber K., Bilbo S., Blurton-Jones M., Boddeke E., Brites D., Brône B., Brown G.C., Butovsky O., Carson M.J., Castellano B., Colonna M., Cowley S.A., Cunningham C., Davalos D., De Jager P.L., de Strooper B., Denes A., Eggen B.J.L., Eyo U., Galea E., Garel S., Ginhoux F., Glass C.K., Gokce O., Gomez-Nicola D., González B., Gordon S., Graeber M.B., Greenhalgh A.D., Gressens P., Greter M., Gutmann D.H., Haass C., Heneka M.T., Heppner F.L., Hong S., Hume D.A., Jung S., Kettenmann H., Kipnis J., Koyama R., Lemke G., Lynch M., Majewska A., Mancangio M., Malm T., Mancuso R., Masuda T., Matteoli M., McColl B.W., Miron V.E., Molofsky A.V., Monje M., Mracsko E., Nadjar A., Neher J.J., Neniskyte U., Neumann H., Noda M., Peng B., Peri F., Perry V.H., Popovich P.G., Pridans C., Priller J., Prinz M., Ragozzino D., Ransohoff R.M., Salter M.W., Schaefer A., Schafer D.P., Schwartz M., Simons M., Smith C.J., Streit W.J., Tay T.L., Tsai L.H., Verkhratsky A., von Bernhardi R., Wake H., Wittamer V., Wolf S.A., Wu

- L.J., Wyss-Coray T. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. 2022;110(21):3458-3483. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
135. Michelucci A., Heurtaux T., Grandbarbe L., Morga E., Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*. 2009;210(1-2):3-12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.003.
136. Matcovitch-Natan O., Winter D.R., Giladi A., Vargas Aguilar S., Spinrad A., Sarrazin S., Ben-Yehuda H., David E., Zelada González F., Perrin P., Keren-Shaul H., Gury M., Lara-Astaiso D., Thaiss C.A., Cohen M., Bahar Halpern K., Baruch K., Deczkowska A., Lorenzo-Vivas E., Itzkovitz S., Elinav E., Sieweke M.H., Schwartz M., Amit I. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*. 2016;353(6301):aad8670. doi: 10.1126/science.aad8670.
137. Turner M.R., Cagnin A., Turkheimer F.E., Miller C.C., Shaw C.E., Brooks D.J., Leigh P.N., Banati R.B. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 2004;15(3):601-9. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.012.
138. Henkel J.S., Beers D.R., Siklós L., Appel S.H. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci*. 2006;31(3):427-37. doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.016.
139. Graber D.J., Hickey W.F., Harris B.T. Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2010;7:8. doi: 10.1186/1742-2094-7-8.

140. Xiao Q., Zhao W., Beers D.R., Yen A.A., Xie W., Henkel J.S., Appel S.H. Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem.* 2007;102(6):2008-2019. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x.
141. Beers D.R., Henkel J.S., Xiao Q., Zhao W., Wang J., Yen A.A., Siklos L., McKercher S.R., Appel S.H. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(43):16021-6. doi: 10.1073/pnas.0607423103.
142. Zhao W., Beers D.R., Appel S.H. Immune-mediated mechanisms in the patho-progression of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):888-99. doi: 10.1007/s11481-013-9489-x.
143. Chiu I.M., Chen A., Zheng Y., Kosaras B., Tsiftoglou S.A., Vartanian T.K., Brown R.H. Jr, Carroll M.C. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(46):17913-8. doi: 10.1073/pnas.0804610105.
144. Liu Z., Cheng X., Zhong S., Zhang X., Liu C., Liu F., Zhao C. Peripheral and Central Nervous System Immune Response Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci.* 2020;14:575. doi: 10.3389/fnins.2020.00575.
145. Ferger A.I., Campanelli L., Reimer V., Muth K.N., Merdian I., Ludolph A.C., Witting A. Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia. *J Neuroinflammation.* 2010;7:45. doi: 10.1186/1742-2094-7-45.
146. Miller R.G., Zhang R., Bracci P.M., Azhir A., Barohn R., Bedlack R., Benatar M., Berry J.D., Cudkovicz M., Kasarskis E.J., Mitsumoto H., Manousakis G., Walk D., Oskarsson B., Shefner J., McGrath M.S. Phase 2B randomized controlled trial of NP001 in amyotrophic lateral sclerosis: Pre-specified and post hoc analyses. *Muscle Nerve.* 2022;66(1):39-49. doi: 10.1002/mus.27511.

147. Chiot A., Zaïdi S., Iltis C., Ribon M., Berriat F., Schiaffino L., Jolly A., de la Grange P., Mallat M., Bohl D., Millecamps S., Seilhean D., Lobsiger C.S., Boillée S. Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nat Neurosci.* 2020;23(11):1339-1351. doi: 10.1038/s41593-020-00718-z.
148. Anderson G. Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathoetiology and Pathophysiology: Roles of Astrocytes, Gut Microbiome, and Muscle Interactions via the Mitochondrial Melatonergic Pathway, with Disruption by Glyphosate-Based Herbicides. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):587. doi: 10.3390/ijms24010587.
149. Goutman S.A., Boss J., Patterson A., Mukherjee B., Batterman S., Feldman E.L. High plasma concentrations of organic pollutants negatively impact survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(8):907-912. doi: 10.1136/jnnp-2018-319785.
150. Andrews W.D., Tuke P.W., Al-Chalabi A., Gaudin P., Ijaz S., Parton M.J., Garson J.A. Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease. *J Med Virol.* 2000;61(4):527-32. doi: 10.1002/1096-9071(200008)61:4<527::aid-jmv17>3.0.co;2-a.
151. Berger M.M., Kopp N., Vital C., Redl B., Aymard M., Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology.* 2000;54(1):20-5. doi: 10.1212/wnl.54.1.20.
152. Verma A., Berger J.R. ALS syndrome in patients with HIV-1 infection. *J Neurol Sci.* 2006;240(1-2):59-64. doi: 10.1016/j.jns.2005.09.005.
153. Klein J.P, Sun Z., Staff N.P. Association between ALS and retroviruses: evidence from bioinformatics analysis. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl 24):680. doi: 10.1186/s12859-019-3249-8.

154. Li W., Lee M.H., Henderson L., Tyagi R., Bachani M., Steiner J., Campanac E., Hoffman D.A., von Geldern G., Johnson K., Maric D., Morris H.D., Lentz M., Pak K., Mammen A., Ostrow L., Rothstein J., Nath A. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(307):307ra153. doi: 10.1126/scitranslmed.aac8201.
155. Vega A., Bell E.A. α -amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*. 1967;6,759–62. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86018-5.
156. Bradley W.G. The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre in the University of Newcastle and the BMAA Theory of Motor Neuron Disease. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(s2):S77-S81. doi: 10.3233/JND-150090.
157. Cox P.A., Kostrzewa R.M., Guillemin G.J. BMAA and Neurodegenerative Illness. *Neurotox Res*. 2018;33(1):178-183. doi: 10.1007/s12640-017-9753-6.
158. Westeneng H.J., van Veenhuijzen K., van der Spek R.A., Peters S., Visser A.E., van Rheenen W., Veldink J.H., van den Berg L.H. Associations between lifestyle and amyotrophic lateral sclerosis stratified by C9orf72 genotype: a longitudinal, population-based, case-control study. *Lancet Neurol*. 2021;20(5):373-384. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00042-9.
159. Huisman M.H., Seelen M., van Doormaal P.T., de Jong S.W., de Vries J.H., van der Kooi A.J., de Visser M., Schelhaas H.J., van den Berg L.H., Veldink J.H. Effect of Presymptomatic Body Mass Index and Consumption of Fat and Alcohol on Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2015;72(10):1155-62. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1584.

160. Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology*. 2012;33(3):391-400. doi: 10.1016/j.neuro.2012.03.011.
161. Su F.C., Goutman S.A., Chernyak S., Mukherjee B., Callaghan B.C., Batterman S., Feldman E.L. Association of Environmental Toxins With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):803-11. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0594.
162. Singh N., Haldar S., Tripathi A.K., Horback K., Wong J., Sharma D., Beserra A., Suda S., Anbalagan C., Dev S., Mukhopadhyay C.K., Singh A. Brain iron homeostasis: from molecular mechanisms to clinical significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(8):1324-63. doi: 10.1089/ars.2012.4931.
163. Winkler E.A., Sengillo J.D., Sagare A.P., Zhao Z., Ma Q., Zuniga E., Wang Y., Zhong Z., Sullivan J.S., Griffin J.H., Cleveland D.W., Zlokovic B.V. Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(11):E1035-42. doi: 10.1073/pnas.1401595111.
164. Peters S., Broberg K., Gallo V., Levi M., Kippler M., Vineis P., Veldink J., van den Berg L., Middleton L., Travis R.C., Bergmann M.M., Palli D., Grioni S., Tumino R., Elbaz A., Vlaar T., Mancini F., Kühn T., Katzke V., Agudo A., Goñi F., Gómez J.H., Rodríguez-Barranco M., Merino S., Barricarte A., Trichopoulou A., Jenab M., Weiderpass E., Vermeulen R. Blood Metal Levels and Amyotrophic Lateral Sclerosis Risk: A Prospective Cohort. *Ann Neurol*. 2021;89(1):125-133. doi: 10.1002/ana.25932.
165. Golko-Perez S., Mandel S., Amit T., Kupersmidt L., Youdim M.B., Weinreb O. Additive Neuroprotective Effects of the Multifunctional Iron Chelator M30 with

- Enriched Diet in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotox Res.* 2016;29(2):208-17. doi: 10.1007/s12640-015-9574-4.
166. Barbeito A.G., Martinez-Palma L., Vargas M.R., Pehar M., Mañay N., Beckman J.S., Barbeito L., Cassina P. Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis.* 2010;37(3):574-80. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.007.
167. Arvidson B. Inorganic mercury is transported from muscular nerve terminals to spinal and brainstem motoneurons. *Muscle Nerve.* 1992;15(10):1089-94. doi: 10.1002/mus.880151006.
168. Bassett T., Bach P., Chan H.M. Effects of methylmercury on the secretion of pro-inflammatory cytokines from primary microglial cells and astrocytes. *Neurotoxicology.* 2012;33(2):229-34. doi: 10.1016/j.neuro.2011.10.003.
169. Maraldi T., Riccio M., Zambonin L., Vinceti M., De Pol A., Hakim G. Low levels of selenium compounds are selectively toxic for a human neuron cell line through ROS/RNS increase and apoptotic process activation. *Neurotoxicology.* 2011;32(2):180-7. doi: 10.1016/j.neuro.2010.10.008.
170. Estevez A.O., Mueller C.L., Morgan K.L., Szewczyk N.J., Teece L., Miranda-Vizuete A., Estevez M. Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology.* 2012;33(5):1021-32. doi: 10.1016/j.neuro.2012.04.019.
171. Nutini M., Frazzini V., Marini C., Spalloni A., Sensi S.L., Longone P. Zinc pre-treatment enhances NMDAR-mediated excitotoxicity in cultured cortical neurons from SOD1(G93A) mouse, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology.* 2011;60(7-8):1200-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.11.001.

172. Ermilova I.P., Ermilov V.B., Levy M., Ho E., Pereira C., Beckman J.S. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci Lett.* 2005;379(1):42-6. doi: 10.1016/j.neulet.2004.12.045.
173. Trumbull K.A., Beckman J.S. A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(7):1627-39. doi: 10.1089/ars.2009.2574.
174. Groeneveld G.J., de Leeuw van Weenen J., van Muiswinkel F.L., Veldman H., Veldink J.H., Wokke J.H., Bär P.R., van den Berg L.H. Zinc amplifies mSOD1-mediated toxicity in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2003;352(3):175-8. doi: 10.1016/j.neulet.2003.08.062.
175. Zhou H., Chen G., Chen C., Yu Y., Xu Z. Association between extremely low-frequency electromagnetic fields occupations and amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e48354. doi: 10.1371/journal.pone.0048354.
176. Al-Chalabi A., Hardiman O.. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneuro.2013.203.
177. Gotkine M., Friedlander Y., Hochner H. Triathletes are over-represented in a population of patients with ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15(7-8):534-6. doi: 10.3109/21678421.2014.932383.
178. Fang F., Hällmarker U., James S., Ingre C., Michaëlsson K., Ahlbom A., Feychting M. Amyotrophic lateral sclerosis among cross-country skiers in Sweden. *Eur J Epidemiol.* 2016;31(3):247-53. doi: 10.1007/s10654-015-0077-7.

179. Dupuis L., Pradat P.F., Ludolph A.C., Loeffler J.P. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 2011;10(1):75-82. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70224-6.
180. Michels S., Kurz D., Rosenbohm A., Peter R.S., Just S., Bätzner H., Börtlein A., Dettmers C., Gold H.J., Kohler A., Naumann M., Ratzka P., Ludolph A.C., Rothenbacher D., Nagel G., Dorst J. ALS Registry Swabia Study Group. Association of blood lipids with onset and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS Swabia registry. *J Neurol.* 2023;270(6):3082-3090. doi: 10.1007/s00415-023-11630-4.
181. Agrawal I., Lim Y.S., Ng S.Y., Ling S.C. Deciphering lipid dysregulation in ALS: from mechanisms to translational medicine. *Transl Neurodegener.* 2022;11(1):48. doi: 10.1186/s40035-022-00322-0.
182. Horner R.D., Grambow S.C., Coffman C.J., Lindquist J.H., Oddone E.Z., Allen K.D., Kasarskis E.J. Amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans: evidence for a time-limited outbreak. *Neuroepidemiology.* 2008;31(1):28-32. doi: 10.1159/000136648.
183. Haley R.W. Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology.* 2003;61(6):750-6. doi: 10.1212/wnl.61.6.750.
184. Nicolson G.L, Nasralla M.Y., Haier J., Pomfret J. High frequency of systemic mycoplasmal infections in Gulf War veterans and civilians with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *J Clin Neurosci.* 2002;9(5):525-9. doi: 10.1054/jocn.2001.1075.
185. Cox P.A., Richer R., Metcalf J.S., Banack S.A., Codd G.A., Bradley W.G. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS

- among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10 Suppl 2:109-17.
doi: 10.3109/17482960903286066.
186. Tillett W.S., Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930;52(4):561-71. doi: 10.1084/jem.52.4.561.
187. Pepys M.B., Hirschfield G.M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1805-12. doi: 10.1172/JCI18921. Erratum in: *J Clin Invest.* 2003;112(2):299.
188. Yasojima K., Schwab C., McGeer E.G., McGeer P.L. Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2000;887(1):80-9. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02970-x.
189. Bhattacharya S., Munshi C. Biological significance of C-reactive protein, the ancient acute phase functionary. *Front Immunol.* 2023;14:1238411. doi: 10.3389/fimmu.2023.1238411.
190. Ferrucci L., Corsi A., Lauretani F., Bandinelli S., Bartali B., Taub D.D., Guralnik J.M., Longo D.L. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood.* 2005;105(6):2294-9. doi: 10.1182/blood-2004-07-2599.
191. Mehta N., Luthra N.S., Corcos D.M., Fantuzzi G. C-reactive protein as the biomarker of choice to monitor the effects of exercise on inflammation in Parkinson's disease. *Front Immunol.* 2023;14:1178448. doi: 10.3389/fimmu.2023.1178448.
192. Jungen M.J., Ter Meulen B.C., van Osch T., Weinstein H.C., Ostelo R.W.J.G. Inflammatory biomarkers in patients with sciatica: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019;20(1):156. doi: 10.1186/s12891-019-2541-0.

193. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):649-58. doi: 10.1160/TH14-01-0085.
194. de Moerloose P., Casini A., Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(6):585-95. doi: 10.1055/s-0033-1349222.
195. Surma S., Banach M. Fibrinogen and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases- Review of the Literature and Clinical Studies. *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):193. doi: 10.3390/ijms23010193.
196. Schultz D.R., Arnold P.I. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum.* 1990;20(3):129-47. doi: 10.1016/0049-0172(90)90055-k.
197. Kannel W.B., Wolf P.A., Castelli W.P., D'Agostino R.B. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA.* 1987;258(9):1183-6. doi: 10.1001/jama.1987.03400090067035.
198. Fibrinogen Studies Collaboration; Danesh J., Lewington S., Thompson S.G., Lowe G.D., Collins R., Kostis J.B., Wilson A.C., Folsom A.R., Wu K., Benderly M., Goldbourt U., Willeit J., Kiechl S., Yarnell J.W., Sweetnam P.M., Elwood P.C., Cushman M., Psaty B.M., Tracy R.P., Tybjaerg-Hansen A., Haverkate F., de Maat M.P., Fowkes F.G., Lee A.J., Smith F.B., Salomaa V., Harald K., Rasi R., Vahtera E., Jousilahti P., Pekkanen J., D'Agostino R., Kannel W.B., Wilson P.W., Tofler G., Arocha-Piñango C.L., Rodriguez-Larralde A., Nagy E., Mijares M., Espinosa R., Rodriguez-Roa E., Ryder E., Diez-Ewald M.P., Campos G., Fernandez V., Torres E., Marchioli R., Valagussa F., Rosengren A., Wilhelmsen L., Lappas G., Eriksson H., Cremer P., Nagel D., Curb J.D., Rodriguez B., Yano K., Salonen

- J.T., Nyyssönen K., Tuomainen T.P., Hedblad B., Lind P., Loewel H., Koenig W., Meade T.W., Cooper J.A., De Stavola B., Knottenbelt C., Miller G.J., Cooper J.A., Bauer K.A., Rosenberg R.D., Sato S., Kitamura A., Naito Y., Palosuo T., Ducimetiere P., Amouyel P., Arveiler D., Evans A.E., Ferrieres J., Juhan-Vague I., Bingham A., Schulte H., Assmann G., Cantin B., Lamarche B., Després J.P., Dagenais G.R., Tunstall-Pedoe H., Woodward M., Ben-Shlomo Y., Davey Smith G., Palmieri V., Yeh J.L., Rudnicka A., Ridker P., Rodeghiero F., Tosetto A., Shepherd J., Ford I., Robertson M., Brunner E., Shipley M., Feskens E.J., Kroonhout D., Dickinson A., Ireland B., Juzwishin K., Kaptoge S., Lewington S., Memon A., Sarwar N., Walker M., Wheeler J., White I., Wood A. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005;294(14):1799-809. doi: 10.1001/jama.294.14.1799. Erratum in: *JAMA*. 2005;294(22):2848.
199. Vilar R., Fish R.J., Casini A., Neerman-Arbez M. Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*. 2020;105(2):284-296. doi: 10.3324/haematol.2019.236901.
200. Schachtrup C., Ryu J.K., Helmrick M.J., Vagena E., Galanakis D.K., Degen J.L., Margolis R.U., Akassoglou K. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci*. 2010;30(17):5843-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0137-10.2010.
201. Petersen M.A., Ryu J.K., Akassoglou K. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(5):283-301. doi: 10.1038/nrn.2018.13.
202. Davalos D., Ryu J.K., Merlini M., Baeten K.M., Le Moan N., Petersen M.A., Deerinck T.J., Smirnoff D.S., Bedard C., Hakozaki H., Gonias Murray S., Ling

- J.B., Lassmann H., Degen J.L., Ellisman M.H., Akassoglou K. Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun.* 2012;3:1227. doi: 10.1038/ncomms2230.
203. Ryu J.K., Petersen M.A., Murray S.G., Baeten K.M., Meyer-Franke A., Chan J.P., Vagena E., Bedard C., Machado M.R., Rios Coronado P.E., Prod'homme T., Charo I.F., Lassmann H., Degen J.L., Zamvil S.S., Akassoglou K. Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *Nat Commun.* 2015;6:8164. doi: 10.1038/ncomms9164.
204. Lohmeier J., Silva R.V., Tietze A., Taupitz M., Kaneko T., Prüss H., Paul F., Infante-Duarte C., Hamm B., Caravan P., Makowski M.R. Fibrin-targeting molecular MRI in inflammatory CNS disorders. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2022;49(11):3692-3704. doi: 10.1007/s00259-022-05807-8.
205. Bell R.D., Winkler E.A., Sagare A.P., Singh I., LaRue B., Deane R., Zlokovic B.V. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron.* 2010;68(3):409-27. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.043. Erratum in: *Neuron.* 2023;111(19):3131-3132.
206. Riley L.K., Rupert J. Evaluation of Patients with Leukocytosis. *Am Fam Physician.* 2015;92(11):1004-11.
207. Zamudio F., Loon A.R., Smeltzer S., Benyamine K., Navalpur Shanmugam N.K., Stewart N.J.F., Lee D.C., Nash K., Selenica M.B. TDP-43 mediated blood-brain barrier permeability and leukocyte infiltration promote neurodegeneration in a low-grade systemic inflammation mouse model. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):283. doi: 10.1186/s12974-020-01952-9.

208. McCauley M.E., O'Rourke J.G., Yáñez A., Markman J.L., Ho R., Wang X., Chen S., Lall D., Jin M., Muhammad A.K.M.G., Bell S., Landeros J., Valencia V., Harms M., Arditi M., Jefferies C., Baloh R.H. C9orf72 in myeloid cells suppresses STING-induced inflammation. *Nature*. 2020;585(7823):96-101. doi: 10.1038/s41586-020-2625-x.
209. Chakraborty S., Tabrizi Z., Bhatt N.N., Franciosa S.A., Bracko O. A Brief Overview of Neutrophils in Neurological Diseases. *Biomolecules*. 2023;13(5):743. doi: 10.3390/biom13050743.
210. Chabot-Richards D.S., George T.I. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):279-88. doi: 10.1111/ijlh.12212.
211. Cai W., Liu S., Hu M., Huang F., Zhu Q., Qiu W., Hu X., Colello J., Zheng S.G., Lu Z. Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2020;11(1):108-121. doi: 10.1007/s12975-019-00694-y.
212. Rossi B., Constantin G., Zenaro E. The emerging role of neutrophils in neurodegeneration. *Immunobiology*. 2020;225(1):151865. doi: 10.1016/j.imbio.2019.10.014.
213. Trias E., King P.H., Si Y., Kwon Y., Varela V., Ibarburu S., Kovacs M., Moura I.C., Beckman J.S., Hermine O., Barbeito L. Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight*. 2018;3(19):e123249. doi: 10.1172/jci.insight.123249.
214. Kurimoto T., Yin Y., Habboub G., Gilbert H.Y., Li Y., Nakao S., Hafezi-Moghadam A., Benowitz L.I. Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration. *J Neurosci*. 2013;33(37):14816-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5511-12.2013.

215. Omman R.A., Kini A.R. Leukocyte development, kinetics, and functions. W: Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications (red. E.M. Keohane, C.N. Otto, J.N. Walenga). Wyd. 6. St. Louis: Elsevier, 2020. s. 117–135. ISBN: 978-0-323-53045-3.
216. Wik J.A., Skålhegg B.S. T Cell Metabolism in Infection. *Front Immunol.* 2022;13:840610. doi: 10.3389/fimmu.2022.840610.
217. Kawamata T., Akiyama H., Yamada T., McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 1992;140(3):691-707.
218. Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Appel S.H. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(40):15558-63. doi: 10.1073/pnas.0807419105.
219. Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Huang A., Wen S., Liao B., Appel S.H. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2011;134(Pt 5):1293-314. doi: 10.1093/brain/awr074.
220. McCombe P.A., Lee J.D., Woodruff T.M., Henderson R.D. The Peripheral Immune System and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol.* 2020;11:279. doi: 10.3389/fneur.2020.00279.
221. Banerjee R., Mosley R.L., Reynolds A.D., Dhar A., Jackson-Lewis V., Gordon P.H., Przedborski S., Gendelman H.E. Adaptive immune neuroprotection in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *PLoS One.* 2008;3(7):e2740. doi: 10.1371/journal.pone.0002740.

222. Thonhoff J.R., Berry J.D., Macklin E.A., Beers D.R., Mendoza P.A., Zhao W., Thome A.D., Triolo F., Moon J.J., Paganoni S., Cudkovicz M., Appel S.H.. Combined Regulatory T-Lymphocyte and IL-2 Treatment Is Safe, Tolerable, and Biologically Active for 1 Year in Persons With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2022;9(6):e200019. doi: 10.1212/NXI.0000000000200019.
223. Rajabinejad M., Ranjbar S., Afshar Hezarkhani L., Salari F., Gorgin Karaji A., Rezaieyanesh A. Regulatory T cells for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease: A clinical and preclinical systematic review. *J Cell Physiol.* 2020 Jun;235(6):5030-5040. doi: 10.1002/jcp.29401.
224. Niebroj-Dobosz I., Dziewulska D., Janik P. Auto-antibodies against proteins of spinal cord cells in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Folia Neuropathol.* 2006;44(3):191-6.
225. Naor S., Keren Z., Bronshtein T., Goren E., Machluf M., Melamed D. Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes. *J Neurol.* 2009;256(8):1228-35. doi: 10.1007/s00415-009-5097-3.
226. Kuźniar-Placek J., Pacyna M., Jaroszyński A. Znaczenie wskaźnika neutrofilowo-limfocytowego w chorobach układu sercowo-naczyniowego. *Folia Cardiol.* 2016;11(6):525–528. doi: 10.5603/FC.2016.0109.
227. Templeton A.J., McNamara M.G., Šeruga B., Vera-Badillo F.E., Aneja P., Ocaña A., Leibowitz-Amit R., Sonpavde G., Knox J.J., Tran B., Tannock I.F., Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(6):dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124.

228. Azab B., Camacho-Rivera M., Taioli E. Average values and racial differences of neutrophil lymphocyte ratio among a nationally representative sample of United States subjects. *PLoS One*. 2014;9(11):e112361. doi: 10.1371/journal.pone.0112361.
229. Petrone A.B., Eisenman R.D., Steele K.N., Mosmiller L.T., Urhie O, Zdilla M.J. Temporal dynamics of peripheral neutrophil and lymphocytes following acute ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2019;40(9):1877-1885. doi: 10.1007/s10072-019-03919-y.
230. Kocaturk O., Besli F., Gungoren F., Kocaturk M., Tanriverdi Z. The relationship among neutrophil to lymphocyte ratio, stroke territory, and 3-month mortality in patients with acute ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2019;40(1):139-146. doi: 10.1007/s10072-018-3604-y.
231. Celikbilek A., Ismailogullari S., Zararsiz G. Neutrophil to lymphocyte ratio predicts poor prognosis in ischemic cerebrovascular disease. *J Clin Lab Anal*. 2014;28(1):27-31. doi: 10.1002/jcla.21639.
232. Pektezel M.Y., Yilmaz E., Arsava E.M., Topcuoglu M.A. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Response to Intravenous Thrombolysis in Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019;28(7):1853-1859. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.04.014.
233. Bisgaard A.K., Pihl-Jensen G., Frederiksen J.L. The neutrophil-to-lymphocyte ratio as disease activity marker in multiple sclerosis and optic neuritis. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;18:213-217. doi: 10.1016/j.msard.2017.10.009.
234. Olsson A., Gustavsen S., Gisselø Lauridsen K., Chenoufi Hasselbalch I., Selbjerg F., Bach Søndergaard H., Bang Oturai A. Neutrophil-to-lymphocyte ratio

- and CRP as biomarkers in multiple sclerosis: A systematic review. *Acta Neurol Scand.* 2021;143(6):577-586. doi: 10.1111/ane.13401.
235. Muñoz-Delgado L., Macías-García D., Jesús S., Martín-Rodríguez J.F., Labrador-Espinosa M.Á., Jiménez-Jaraba M.V., Adarmes-Gómez A., Carrillo F., Mir P. Peripheral Immune Profile and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021;36(10):2426-2430. doi: 10.1002/mds.28685.
236. Sanjari Moghaddam H., Ghazi Sherbaf F., Mojtahed Zadeh M., Ashraf-Ganjouei A., Aarabi M.H. Association Between Peripheral Inflammation and DATSCAN Data of the Striatal Nuclei in Different Motor Subtypes of Parkinson Disease. *Front Neurol.* 2018;9:234. doi: 10.3389/fneur.2018.00234.
237. Song L., Zhang S., Li H., Hansson O., Sonestedt E., Borné Y. Comparison of risk factors for Parkinson's disease, coronary events and ischemic stroke. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022;8(1):107. doi: 10.1038/s41531-022-00374-z.
238. Halazun H.J., Mergeche J.L., Mallon K.A., Connolly E.S., Heyer E.J. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of cognitive dysfunction in carotid endarterectomy patients. *J Vasc Surg.* 2014;59(3):768-73. doi: 10.1016/j.jvs.2013.08.095.
239. Pius-Sadowska E., Machaliński B. Rola osi neurotrofyny/receptory neurotrofynowe w regulacji homeostazy tkanki nerwowej. *Post Biol Komórki.* 2014;2:285-314.
240. Wysokiński A., Gruszczyński W. Neurotrofyny aktualny stan wiedzy. *Post Psychiatr Neurol.* 2008; 17: 385-390.
241. Franco M.L., Comaposada-Baró R., Vilar M. Neurotrophins and Neurotrophin receptors. W: *Hormonal signaling in biology and medicine.* (red. G. Litwack). Amsterdam: Elsevier, 2019. ISBN: 978-0128138144.

242. Nykjaer A., Lee R., Teng K.K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M.S., Jacobsen C., Kliemannel M., Schwarz E., Willnow T.E., Hempstead B.L., Petersen C.M. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. 2004;427:843-8. doi: 10.1038/nature02319.
243. Montroull L.E., Danelon V., Cragolini A.B., Mascó D.H. Loss of TrkB Signaling Due to Status Epilepticus Induces a proBDNF-Dependent Cell Death. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:4. doi: 10.3389/fncel.2019.00004.
244. Costa R.O., Perestrelo T., Almeida R.D. PROneurotrophins and CONSequences. *Mol Neurobiol*. 2018;55:2934–2951. doi: 10.1007/s12035-017-0505-7.
245. Woszczycka-Korczyńska I., Lewin-Kowalik J., Górka D. Neurotrofiny w biologii i medycynie. *Pol Merkariusz Lek*. 2006;119:602-605.
246. Roux P.P., Barker P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002;67:203-233. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00016-3.
247. Manti S., Brown P., Perez M.K., Piedimonte G. The Role of Neurotrophins in Inflammation and Allergy. *Vitam Horm*. 2017;104:313-341. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.010.
248. Edling A.E., Nanavati T., Johnson J.M., Tuohy V.K. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res*. 2004;77(5):709-17. doi: 10.1002/jnr.20176.
249. Correale J., Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol*. 2004;251(11):1304-16. doi: 10.1007/s00415-004-0649-z.
250. Küst B.M., Copray J.C., Brouwer N., Troost D., Boddeke H.W. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2002;177(2):419-27. doi: 10.1006/exnr.2002.8011.

251. Cudkowicz M.E., Lindborg S.R., Goyal N.A., Miller R.G., Burford M.J., Berry J.D., Nicholson K.A., Mzzaffar T., Katz J.S., Jenkins L.J., Baloh R.H., Lewis R.A., Staff N.P., Owegi M.A., Berry D.A., Gothelf Y., Levy Y.S., Aricha R., Kern R.Z., Windebank A.J., Brown R.H. Jr. A randomized placebo-controlled phase 3 study of mesenchymal stem cells induced to secrete high levels of neurotrophic factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2022;65(3):291-302. doi: 10.1002/mus.27472.
252. Li J.T., Dong S.Q., Qian T., Yang W.B., Chen X.J. Mouse Nerve Growth Factor Injection and Progression Rate in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Observational Study. *Front Neurol*. 2022;13:829569. doi: 10.3389/fneur.2022.829569.
253. Aquilonius S.M., Askmark H., Ebendal T., Gillberg P.G. No re-expression of high-affinity nerve growth factor binding sites in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol*. 1992;32(4):216-8. doi: 10.1159/000116825.
254. Adem A., Ekblom J., Gillberg P.G. Growth factor receptors in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*. 1994;9(1-3):225-31. doi: 10.1007/BF02816121.
255. Zhong S.J., Gong Y.H., Lin Y.C. Combined intranasal nerve growth factor and ventricle neural stem cell grafts prolong survival and improve disease outcome in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2017;656:1-8. doi: 10.1016/j.neulet.2017.07.005.
256. Lorenzini L., Baldassarro V.A., Stanzani A., Giardino L. Nerve Growth Factor: The First Molecule of the Neurotrophin Family. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1331:3-10. doi: 10.1007/978-3-030-74046-7_1.

257. Aarão T.L.S., de Sousa J.R., Falcão A.S.C., Falcão L.F.M., Quaresma J.A.S.
Nerve Growth Factor and Pathogenesis of Leprosy: Review and Update. *Front Immunol.* 2018;9:939. doi: 10.3389/fimmu.2018.00939.
258. Lambiase A., Bracci-Laudiero L., Bonini S., Bonini S., Starace G., D'Elia M.M., De Carli M., Aloe L. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(3):408-14. doi: 10.1016/s0091-6749(97)70256-2.
259. Massaro A.R., Soranzo C., Bigon E., Battiston S., Morandi A., Carnevale A., Callegaro L. Nerve growth factor (NGF) in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with various neurological disorders. *Ital J Neurol Sci.* 1994;15(2):105-8. doi: 10.1007/BF02340121.
260. Takei Y., Laskey R. Intracellular and intercellular cross talk between NGF and TNF. *Adv Exp Med Biol.* 2011;691:559-65. doi: 10.1007/978-1-4419-6612-4_58.
261. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x.
262. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(3):579-593. doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
263. Ribeiro F.F., Xapelli S. Intervention of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Other Neurotrophins in Adult Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1331:95-115. doi: 10.1007/978-3-030-74046-7_8.
264. Foltran R.B, Diaz S.L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem.* 2016;138(2):204-21. doi: 10.1111/jnc.13658.

265. Jones K.R., Fariñas I., Backus C., Reichardt L.F. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*. 1994;76(6):989-99. doi: 10.1016/0092-8674(94)90377-8.
266. Slack S.E., Pezet S., McMahon S.B., Thompson S.W, Malcangio M. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2004;20(7):1769-78. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03656.x.
267. Ding H., Chen J., Su M., Lin Z., Zhan H., Yang F., Li W., Xie J., Huang Y., Liu X., Liu B., Zhou X. BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):19. doi: 10.1186/s12974-020-1704-0.
268. Shruthi S., Sumitha R., Varghese A.M., Ashok S., Chandrasekhar Sagar B.K., Sathyaprabha T.N., Nalini A., Kramer B.W., Raju T.R., Vijayalakshmi K., Alladi P.A. Brain-Derived Neurotrophic Factor Facilitates Functional Recovery from ALS-Cerebral Spinal Fluid-Induced Neurodegenerative Changes in the NSC-34 Motor Neuron Cell Line. *Neurodegener Dis*. 2017;17(1):44-58. doi: 10.1159/000447559.
269. Szuhany K.L., Bugatti M., Otto M.W. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychiatr Res*. 2015;60:56-64. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.10.003.
270. Han R., Liu Z., Sun N., Liu S., Li L., Shen Y., Xiu J., Xu Q. BDNF Alleviates Neuroinflammation in the Hippocampus of Type 1 Diabetic Mice via Blocking the Aberrant HMGB1/RAGE/NF- κ B Pathway. *Aging Dis*. 2019;10(3):611-625. doi: 10.14336/AD.2018.0707.

271. Zhao S., Zhang Z., Xu D., Wang Y., Li L. Selective Loss of Brain-Derived Neurotrophic Factor Exacerbates Brain Injury by Enhancing Neuroinflammation in Experimental *Streptococcus pneumoniae* Meningitis. *Front Immunol.* 2020;11:1357. doi: 10.3389/fimmu.2020.01357.
272. Bohmwald K., Andrade C.A., Mora V.P., Muñoz J.T., Ramírez R., Rojas M.F., Kalergis A.M. Neurotrophin Signaling Impairment by Viral Infections in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5817. doi: 10.3390/ijms23105817.
273. Chiaretti A., Capozzi D., Mariotti P., Valentini P., Manni L., Buonsenso D., Fantacci C., Ferrara P. Increased levels of neurotrophins in the cerebrospinal fluid of children with Epstein-Barr virus meningoencephalitis. *Int J Infect Dis.* 2014;20:52-7. doi: 10.1016/j.ijid.2013.11.006.
274. Michael H., Mpofana T., Ramlall S., Oosthuizen F. The Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in HIV-Associated Neurocognitive Disorder: From the Bench-Top to the Bedside. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020;16:355-367. doi: 10.2147/NDT.S232836.
275. Baj G., Carlino D., Gardossi L., Tongiorgi E. Toward a unified biological hypothesis for the BDNF Val66Met-associated memory deficits in humans: a model of impaired dendritic mRNA trafficking. *Front Neurosci.* 2013;7:188. doi: 10.3389/fnins.2013.00188.
276. Lu B., Nagappan G., Guan X., Nathan P.J., Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(6):401-16. doi: 10.1038/nrn3505.

277. Azman K.F., Zakaria R. Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6827. doi: 10.3390/ijms23126827.
278. Pradhan J., Noakes P.G., Bellingham M.C. The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:368. doi: 10.3389/fncel.2019.00368.
279. Hacıoğlu G., Sentürk A., Ince I., Alver A. Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19:388–93.
280. Tosolini A.P., Sleigh J.N., Surana S., Rhymes E.R., Cahalan S.D., Schiavo G. BDNF-dependent modulation of axonal transport is selectively impaired in ALS. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):121. doi: 10.1186/s40478-022-01418-4.
281. Yanpallewar S., Fulgenzi G., Tomassoni-Ardori F., Barrick C., Tessarollo L. Delayed onset of inherited ALS by deletion of the BDNF receptor TrkB.T1 is non-cell autonomous. *Exp Neurol.* 2021;337:113576. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113576.
282. Martin L.J., Wong M. Skeletal Muscle-Restricted Expression of Human SOD1 in Transgenic Mice Causes a Fatal ALS-Like Syndrome. *Front Neurol.* 2020;11:592851. doi: 10.3389/fneur.2020.592851.
283. Just-Borràs L, Hurtado E, Cilleros-Mañé V, Biondi O, Charbonnier F, Tomàs M, Garcia N, Lanuza MA, Tomàs J. Overview of Impaired BDNF Signaling, Their Coupled Downstream Serine-Threonine Kinases and SNARE/SM Complex in the Neuromuscular Junction of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Model SOD1-G93A Mice. *Mol Neurobiol.* 2019;56(10):6856-6872. doi: 10.1007/s12035-019-1550-1.

284. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990;247(4949 Pt 1):1446-51. doi: 10.1126/science.247.4949.1446.
285. Skaper S.D. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018;1727:1-17. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
286. Hernández-Echeagaray E. Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission. *Vitam Horm*. 2020;114:71-89. doi: 10.1016/bs.vh.2020.04.008.
287. Han K.A., Woo D., Kim S., Choi G., Jeon S., Won S.Y., Kim H.M., Heo W.D., Um J.W., Ko J. Neurotrophin-3 Regulates Synapse Development by Modulating TrkC-PTP σ Synaptic Adhesion and Intracellular Signaling Pathways. *J Neurosci*. 2016;36(17):4816-31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4024-15.2016.
288. Keefe K.M., Sheikh I.S., Smith G.M. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):548. doi: 10.3390/ijms18030548.
289. Dedoni S., Olianias M.C., Ingianni A., Onali P. Interferon- β Inhibits Neurotrophin 3 Signalling and Pro-Survival Activity by Upregulating the Expression of Truncated TrkC-T1 Receptor. *Mol Neurobiol*. 2017;54(3):1825-1843. doi: 10.1007/s12035-016-9789-2.
290. Mizuno Y., Takada H., Urakami K., Ihara K., Kira R., Suminoe A., Ohga S., Aoki T., Hara T. Neurotrophin-3 levels in cerebrospinal fluid from children with bacterial meningitis, viral meningitis, or encephalitis. *J Child Neurol*. 2000;15(1):19-21. doi: 10.1177/088307380001500104.
291. Kizawa-Ueda M., Ueda A., Kawamura N., Ishikawa T., Mutoh E., Fukuda Y., Shiroki R., Hoshinaga K., Ito S., Asakura K., Mutoh T. Neurotrophin levels in

- cerebrospinal fluid of adult patients with meningitis and encephalitis. *Eur Neurol.* 2011;65(3):138-43. doi: 10.1159/000324327.
292. Kobayashi N., Nagata T., Shinagawa S., Nakayama R., Kondo K., Nakayama K., Yamada H. Association between neurotrophin-3 polymorphisms and executive function in Japanese patients with amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2012;34(3-4):190-7. doi: 10.1159/000343075.
293. Silva-Peña D., García-Marchena N., Alén F., Araos P., Rivera P., Vargas A., García-Fernández M.I., Martín-Velasco A.I., Villanúa M.Á., Castilla-Ortega E., Santín L., Pavón F.J., Serrano A., Rubio G., Rodríguez de Fonseca F., Suárez J. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. *Addict Biol.* 2019;24(5):1019-1033. doi: 10.1111/adb.12668.
294. Omar N.A., Kumar J., Teoh S.L. Neurotrophin-3 and neurotrophin-4: The unsung heroes that lies behind the meninges. *Neuropeptides.* 2022;92:102226. doi: 10.1016/j.npep.2022.102226.
295. Mohammadi A., Rashidi E., Amoeian V.G. Brain, blood, cerebrospinal fluid, and serum biomarkers in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2018;265:25-38. doi: 10.1016/j.psychres.2018.04.036.
296. Tyrtysnaia A.A., Manzhulo I.V., Konovalova S.P., Zagliadkina A.A. Neuro-pathic Pain Causes a Decrease in the Dendritic Tree Complexity of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons. *Cells Tissues Organs.* 2019;208(3-4):89-100. doi: 10.1159/000506812.
297. Tonyan S., Pospelova M., Krasnikova V., Fionik O., Alekseeva T., Samochnykh K., Ivanova N., Vavilova T., Vasilieva E., Makhanova A., Nikolaeva A.,

- Bukkiewa T., Combs S., Shevtsov M. Neurotrophin-3 (NT-3) as a Potential Biomarker of the Peripheral Nervous System Damage Following Breast Cancer Treatment. *Pathophysiology*. 2023;30(2):110-122. doi: 10.3390/pathophysiology30020010.
298. Meeker R.B., Poulton W., Markovic-Plese S., Hall C., Robertson K. Protein changes in CSF of HIV-infected patients: evidence for loss of neuroprotection. *J Neurovirol*. 2011;17(3):258-73. doi: 10.1007/s13365-011-0034-5.
299. Zou H., Wang J.Y., Ma G.M., Xu M.M., Luo F., Zhang L., Wang W.Y. The function of FUS in neurodevelopment revealed by the brain and spinal cord organoids. *Mol Cell Neurosci*. 2022;123:103771. doi: 10.1016/j.mcn.2022.103771.
300. Idriss H.T., Naismith J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-95. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
301. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(9):3666-70. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
302. Gonzalez Caldito N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. *Front Immunol*. 2023;14:1213448. doi: 10.3389/fimmu.2023.1213448.
303. Salomon B.L., Leclerc M., Tosello J., Ronin E., Piaggio E., Cohen J.L. Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol*. 2018;9:444. doi: 10.3389/fimmu.2018.00444.
304. Gough P, Myles I.A. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*. 2020;11:585880. doi: 10.3389/fimmu.2020.585880.

305. Atretkhany K.N., Mufazalov I.A., Dunst J., Kuchmiy A., Gogoleva V.S., Andruszewski D., Drutskaya M.S., Faustman D.L., Schwabenland M., Prinz M., Kruglov A.A., Waisman A., Nedospasov S.A. Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(51):13051-13056. doi: 10.1073/pnas.1807499115.
306. Dong T., Bevan G., Zidar D.A., Achirica M.C., Nasir K., Rashid I., Rajagopalan S., Al-Kindi S. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1 is Associated With Cardiovascular Risk in Persons With Coronary Artery Calcium Score of Zero. *Pathog Immun*. 2021;6(2):135-148. doi: 10.20411/pai.v6i2.477.
307. Chadwick W., Magnus T., Martin B., Keselman A., Mattson M.P., Maudsley S. Targeting TNF-alpha receptors for neurotherapeutics. *Trends Neurosci*. 2008;31(10):504-11. doi: 10.1016/j.tins.2008.07.005.
308. Rodriguez M., Zoecklein L., Papke L., Gamez J., Denic A., Macura S., Howe C. Tumor necrosis factor alpha is reparative via TNFR2 in the hippocampus and via TNFR1 in the striatum after virus-induced encephalitis. *Brain Pathol*. 2009;19(1):12-26. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00151.x. Erratum in: *Brain Pathol*. 2011;21(4):477.
309. Brahim F., Maira M., Barcelona P.F., Galan A., Aboukassim T., Teske K., Rogers M.L., Bertram L., Wang J., Yousefi M., Rush R., Fabian M., Cashman N., Saragovi H.U. The Paradoxical Signals of Two TrkC Receptor Isoforms Supports a Rationale for Novel Therapeutic Strategies in ALS. *PLoS One*. 2016;11(10):e0162307. doi: 10.1371/journal.pone.0162307.
310. Nawashiro H., Tasaki K., Ruetzler C.A., Hallenbeck J.M. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb*

- Blood Flow Metab. 1997;17(5):483-90. doi: 10.1097/00004647-199705000-00001.
311. Barger S.W., Hörster D., Furukawa K., Goodman Y., Krieglstein J., Mattson M.P. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(20):9328-32. doi: 10.1073/pnas.92.20.9328.
312. Hartung H.P., Jung S., Stoll G., Zielasek J., Schmidt B., Archelos J.J., Toyka K.V. Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. J Neuroimmunol. 1992;40(2-3):197-210. doi: 10.1016/0165-5728(92)90134-7.
313. Sharief M.K., Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. N Engl J Med. 1991;325(7):467-72. doi: 10.1056/NEJM199108153250704.
314. Liu J., Marino M.W., Wong G., Grail D., Dunn A., Bettadapura J., Slavin A.J., Old L., Bernard C.C. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. Nat Med. 1998;4(1):78-83. doi: 10.1038/nm0198-078.
315. Körner H., Riminton D.S., Strickland D.H., Lemckert F.A., Pollard J.D., Sedgwick J.D. Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting. J Exp Med. 1997;186(9):1585-90. doi: 10.1084/jem.186.9.1585.
316. Abd-El-Basset E.M., Rao M.S., Alshawaf S.M., Ashkanani H.K., Kabli A.H. Tumor necrosis factor (TNF) induces astrogliosis, microgliosis and promotes survival of cortical neurons. AIMS Neurosci. 2021;8(4):558-584. doi: 10.3934/Neuroscience.2021031.

317. Brynskov J., Foegh P., Pedersen G., Ellervik C., Kirkegaard T., Bingham A., Saermark T. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002;51(1):37-43. doi: 10.1136/gut.51.1.37.
318. Victor F.C., Gottlieb A.B. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2002;1(3):264-75.
319. Chaudhry H., Zhou J., Zhong Y., Ali M.M., McGuire F., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 2013;27(6):669-84.
320. Korn T., Magnus T., Jung S. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J*. 2005;19(13):1878-80. doi: 10.1096/fj.05-3748fje.
321. Troost D., van den Oord J.J., de Jong J.M., Swaab D.F. Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropathol*. 1989;8(6):289-94.
322. Mir M., Asensio V.J., Tolosa L., Gou-Fabregas M., Soler R.M., Lladó J., Olmos G. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma cooperatively induce oxidative stress and motoneuron death in rat spinal cord embryonic explants. *Neuroscience*. 2009;162(4):959-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.049.
323. Semmler S., Gagné M., Garg P., Pickles S.R., Baudouin C., Hamon-Keromen E., Destroismaisons L., Khalfallah Y., Chaineau M., Caron E., Bayne A.N., Trempe J.F., Cashman N.R., Star A.T., Haqqani A.S., Durcan T.M., Meiering E.M., Robertson J., Grandvaux N., Plotkin S.S., McBride H.M., Vande Velde C. TNF receptor-associated factor 6 interacts with ALS-linked misfolded superoxide dismutase

- 1 and promotes aggregation. *J Biol Chem.* 2020;295(12):3808-3825. doi: 10.1074/jbc.RA119.011215.
324. Kia A., McAvoy K., Krishnamurthy K., Trotti D., Pasinelli P. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha. *Glia.* 2018;66(5):1016-1033. doi: 10.1002/glia.23298.
325. Jensen B.K., McAvoy K.J., Heinsinger N.M., Lepore A.C., Ilieva H., Haeusler A.R., Trotti D., Pasinelli P. Targeting TNF α produced by astrocytes expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant fused in sarcoma prevents neurodegeneration and motor dysfunction in mice. *Glia.* 2022;70(7):1426-1449. doi: 10.1002/glia.24183.
326. Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.S., Peterson T.C., Wilton D.K., Frouin A., Napier B.A., Panicker N., Kumar M., Buckwalter M.S., Rowitch D.H., Dawson V.L., Dawson T.M., Stevens B., Barres B.A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029.
327. Guo Z., Wu H.T., Li X.X., Yu Y., Gu R.Z., Lan R., Qin X.Y. Edaravone protects rat astrocytes from oxidative or neurotoxic inflammatory insults by restoring Akt/Bcl-2/Caspase-3 signaling axis. *IBRO Rep.* 2020;8:122-128. doi: 10.1016/j.ibror.2020.04.003.
328. Adamek D., Tomik B. Stwardnienie boczne zanikowe. Kraków: ZOZ Ośrodek UMEA Shinoda-Kuracejo, 2005. ISBN 83-915811-5-2.
329. Jenkinson C., Fitzpatrick R., Brennan C., Swash M. Evidence for the validity and reliability of the ALS assessment questionnaire: the ALSAQ-40. *Amyotroph*

- Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 1999;1(1):33-40. doi:
10.1080/146608299300080022.
330. Gołąb-Janowska M., Honczarenko K., Stankiewicz J. Usefulness of the ALSAQ-5 scale in evaluation of quality of life in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neurochir Pol.* 2010;44(6):560-6. doi: 10.1016/s0028-3843(14)60153-5.
331. R&D Systems. Luminex Assay Principle [online]. Dostępny w Internecie: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle> [dostęp 20. kwietnia 2024r.].
332. Baumert B., Sobuś A., Gołąb-Janowska M., Ulańczyk Z., Paczkowska E., Łuczowska K., Zawiaślak A., Milczarek S., Osękowska B., Meller A., Machowska-Sempruch K., Welnicka A., Safranow K., Nowacki P., Machaliński B. Local and Systemic Humoral Response to Autologous Lineage-Negative Cells Intrathecal Administration in ALS Patients. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1070. doi: 10.3390/ijms21031070.
333. Gordon P.H. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging Dis.* 2013;4(5):295-310. doi: 10.14336/AD.2013.0400295.
334. Sun J., Carrero J.J., Zagai U., Evans M., Ingre C., Pawitan Y., Fang F. Blood biomarkers and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2020;27(11):2125-2133. doi: 10.1111/ene.14409.
335. Akıl E., Bulut A., Kaplan İ., Özdemir H.H., Arslan D., Aluçlu M.U. The increase of carcinoembryonic antigen (CEA), high-sensitivity C-reactive protein, and neutrophil/lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2015;36(3):423-8. doi: 10.1007/s10072-014-1976-1.

336. McGeer P.L., McGeer E.G., Yasojima K. Alzheimer disease and neuroinflammation. *J Neural Transm Suppl.* 2000;59:53-7. doi: 10.1007/978-3-7091-6781-6_8.
337. Wang X., Liu Z., Wang P., Li S., Zeng J., Tu X., Yan Q., Xiao Z., Pan M., Zhu F. Syncytin-1, an endogenous retroviral protein, triggers the activation of CRP via TLR3 signal cascade in glial cells. *Brain Behav Immun.* 2018;67:324-334. doi: 10.1016/j.bbi.2017.09.009.
338. Wersching H., Duning T., Lohmann H., Mohammadi S., Stehling C., Fobker M., Conty M., Minnerup J., Ringelstein E.B., Berger K., Deppe M., Knecht S. Serum C-reactive protein is linked to cerebral microstructural integrity and cognitive function. *Neurology.* 2010;74(13):1022-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d7b45b.
339. Hsuchou H., Kastin A.J., Mishra P.K., Pan W. C-reactive protein increases BBB permeability: implications for obesity and neuroinflammation. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(5):1109-19. doi: 10.1159/000343302.
340. Bielewicz J., Kurzepa J., Czekajska-Chehab E., Kamieniak P., Daniluk B., Bartosik-Psujek H. Can CRP affect the blood-brain barrier during acute ischemic stroke? *Pol J Public Health* 2015;125(2): 99-102.
341. Coccaro E.F., Lee R., Coussons-Read M. Cerebrospinal fluid and plasma C-reactive protein and aggression in personality-disordered subjects: a pilot study. *J Neural Transm (Vienna).* 2015;122(2):321-6. doi: 10.1007/s00702-014-1263-6.
342. Coccaro E.F., Lee R., Breen E.C., Irwin M.R. Plasma and cerebrospinal fluid inflammatory markers and human aggression. *Neuropsychopharmacology.* 2023;48(7):1060-1066. doi: 10.1038/s41386-023-01541-3.

343. van Amerongen S., Pulukuri S.V., Tuz-Zahra F., Tripodis Y., Cherry J.D., Bernick C., Geda Y.E., Wethe J.V., Katz D.I., Alosco M.L., Adler C.H., Balcer L.J., Ashton N.J., Blennow K., Zetterberg H., Daneshvar D.H., Colasurdo E.A., Iliff J.J., Li G., Peskind E.R., Shenton M.E., Reiman E.M., Cummings J.L., Stern R.A.; DIAGNOSE CTE Research Project Investigators. Inflammatory biomarkers for neurobehavioral dysregulation in former American football players: findings from the DIAGNOSE CTE Research Project. *J Neuroinflammation*. 2024;21(1):46. doi: 10.1186/s12974-024-03034-6.
344. Amadio P., Porro B., Sandrini L., Fiorelli S., Bonomi A., Cavalca V., Brambilla M., Camera M., Veglia F., Tremoli E., Barbieri S.S. Patho-physiological role of BDNF in fibrin clotting. *Sci Rep*. 2019;9(1):389. doi: 10.1038/s41598-018-37117-1.
345. Moreno I., Stojanovic-Pérez A., Bulduk B., Sánchez-Gistau V., Algora M.J., Ortega L., Muntané G., Vilella E., Labad J., Martorell L. High blood levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in early psychosis are associated with inflammatory markers. *J Psychiatr Res*. 2023;164:440-446. doi: 10.1016/j.jpsychires.2023.07.003.
346. Chen Q., Smith G.M., Shine H.D. Immune activation is required for NT-3-induced axonal plasticity in chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209(2):497-509. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.11.025.
347. Sekimoto M., Tsuji T., Matsuzaki J., Chamoto K., Koda T., Nemoto K., Degawa M., Nishimura S., Nishimura T. Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells. *Immunol Lett*. 2003;88(3):221-6. doi: 10.1016/s0165-2478(03)00080-4.

348. Garofalo S., Coccozza G., Bernardini G., Savage J., Raspa M., Aronica E., Tremblay M.E., Ransohoff R.M., Santoni A., Limatola C. Blocking immune cell infiltration of the central nervous system to tame Neuroinflammation in Amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav Immun.* 2022;105:1-14. doi: 10.1016/j.bbi.2022.06.004.
349. Murdock B.J., Zhou T., Kashlan S.R., Little R.J., Goutman S.A., Feldman E.L. Correlation of Peripheral Immunity With Rapid Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression. *JAMA Neurol.* 2017;74(12):1446-1454. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.2255.
350. Li C., Yang W., Wei Q., Shang H. Causal Association of Leukocytes Count and Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Mendelian Randomization Study. *Mol Neurobiol.* 2020;57(11):4622-4627. doi: 10.1007/s12035-020-02053-7.
351. Provinciali L., Laurenzi M.A., Vesprini L., Giovagnoli A.R., Bartocci C., Montroni M., Bagnarelli P., Clementi M., Varaldo P.E. Immunity assessment in the early stages of amyotrophic lateral sclerosis: a study of virus antibodies and lymphocyte subsets. *Acta Neurol Scand.* 1988;78(6):449-54. doi: 10.1111/j.1600-0404.1988.tb03686.x.
352. Yazdani S., Mariosa D., Hammar N., Andersson J., Ingre C., Walldius G., Fang F. Peripheral immune biomarkers and neurodegenerative diseases: A prospective cohort study with 20 years of follow-up. *Ann Neurol.* 2019;86(6):913-926. doi: 10.1002/ana.25614.
353. Swindell W.R., Kruse C.P.S., List E.O., Berryman D.E., Kopchick J.J. ALS blood expression profiling identifies new biomarkers, patient subgroups, and evidence for neutrophilia and hypoxia. *J Transl Med.* 2019;17(1):170. doi: 10.1186/s12967-019-1909-0.

354. Chiò A., Calvo A., Bovio G., Canosa A., Bertuzzo D., Galmozzi F., Cugnasco P., Clerico M., De Mercanti S., Bersano E., Cammarosano S., Ilardi A., Manera U., Moglia C., Sideri R., Marinou K., Bottacchi E., Pisano F., Cantello R., Mazzini L., Mora G., Piemonte and Valle d'Aosta Register for Amyotrophic Lateral Sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis outcome measures and the role of albumin and creatinine: a population-based study. *JAMA Neurol.* 2014;71(9):1134-42. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1129.
355. Grassano M., Manera U., De Marchi F., Cugnasco P., Matteoni E., Daviddi M., Solero L., Bombaci A., Palumbo F., Vasta R., Canosa A., Salamone P., Fuda G., Casale F., Mazzini L., Calvo A., Moglia C., Chiò A. The role of peripheral immunity in ALS: a population-based study. *Ann Clin Transl Neurol.* 2023;10(9):1623-1632. doi: 10.1002/acn3.51853.
356. Desport J.C., Preux P.M., Magy L., Boirie Y., Vallat J.M., Beaufrère B., Couratier P. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(3):328-34. doi: 10.1093/ajcn/74.3.328.
357. Paillisse C., Lacomblez L., Dib M., Bensimon G., Garcia-Acosta S., Meininger V. Prognostic factors for survival in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with riluzole. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2005;6(1):37-44. doi: 10.1080/14660820510027035.
358. Murdock B.J., Goutman S.A., Boss J., Kim S., Feldman E.L. Amyotrophic Lateral Sclerosis Survival Associates With Neutrophils in a Sex-specific Manner. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(2):e953. doi: 10.1212/NXI.0000000000000953.

359. Cao W., Cao Z., Tian Y., Zhang L., Wang W., Tang L., Xu C., Fan D. Neutrophils Are Associated with Higher Risk of Incident Amyotrophic Lateral Sclerosis in a BMI- and Age-Dependent Manner. *Ann Neurol.* 2023;94(5):942-954. doi: 10.1002/ana.26760.
360. Mantovani S., Garbelli S., Pasini A., Alimonti D., Perotti C., Melazzini M., Bendotti C., Mora G. Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *J Neuroimmunol.* 2009;210(1-2):73-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.012.
361. Gustafson M.P., Staff N.P., Bornschlegl S., Butler G.W., Maas M.L., Kazamel M., Zubair A., Gastineau D.A., Windebank A.J., Dietz A.B. Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* 2017;12(7):e0182002. doi: 10.1371/journal.pone.0182002.
362. Piccoli T., Castro F., La Bella V., Meraviglia S., Di Simone M., Salemi G., Dieli F., Spataro R. Role of the immune system in amyotrophic lateral sclerosis. Analysis of the natural killer cells and other circulating lymphocytes in a cohort of ALS patients. *BMC Neurol.* 2023;23(1):222. doi: 10.1186/s12883-023-03255-x.
363. Chen X., Feng W., Huang R., Guo X., Chen Y., Zheng Z., Shang H. Evidence for peripheral immune activation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2014;347(1-2):90-5. doi: 10.1016/j.jns.2014.09.025.
364. Yang Y., Pan D., Gong Z., Tang J., Li Z., Ding F., Liu M., Zhang M. Decreased blood CD4+ T lymphocyte helps predict cognitive impairment in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurol.* 2021;21(1):157. doi: 10.1186/s12883-021-02185-w.

365. Coque E., Salsac C., Espinosa-Carrasco G., Varga B., Degauque N., Cadoux M., Crabé R., Virenque A., Soulard C., Fierle J.K., Brodovitch A., Libralato M., Végh A.G., Venteo S., Scamps F., Boucraut J., Laplaud D., Hernandez J., Gergely C., Vincent T., Raoul C. Cytotoxic CD8+ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(6):2312-2317. doi: 10.1073/pnas.1815961116.
366. Sheean R.K., McKay F.C., Cretney E., Bye C.R., Perera N.D., Tomas D., Weston R.A., Scheller K.J., Djouma E., Menon P., Schibeci S.D., Marmash N., Yerbury J.J., Nutt S.L., Booth D.R., Stewart G.J., Kiernan M.C., Vucic S., Turner B.J. Association of Regulatory T-Cell Expansion With Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Study of Humans and a Transgenic Mouse Model. *JAMA Neurol*. 2018;75(6):681-689. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.0035.
367. Cui C., Ingre C., Yin L., Li X., Andersson J., Seitz C., Ruffin N., Pawitan Y., Piehl F., Fang F. Correlation between leukocyte phenotypes and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Elife*. 2022;11:e74065. doi: 10.7554/eLife.74065
368. Trolese M.C., Scarpa C., Melfi V., Fabrizio P., Sironi F., Rossi M., Bendotti C., Nardo G. Boosting the peripheral immune response in the skeletal muscles improved motor function in ALS transgenic mice. *Mol Ther*. 2022;30(8):2760-2784. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.04.018.
369. Beers D.R., Zhao W., Wang J., Zhang X., Wen S., Neal D., Thonhoff J.R., Alsuliman A.S., Shpall E.J., Rezvani K., Appel S.H. ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight*. 2017;2(5):e89530. doi: 10.1172/jci.insight.89530.
370. Giovannelli I., Heath P., Shaw P.J., Kirby J. The involvement of regulatory T cells in amyotrophic lateral sclerosis and their therapeutic potential. *Amyotroph*

- Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2020;21(5-6):435-444. doi:
10.1080/21678421.2020.1752246.
371. Rentzos M., Evangelopoulos E., Sereti E., Zouvelou V., Marmara S., Alexakis T., Evdokimidis I. Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation? *Acta Neurol Scand.* 2012;125(4):260-4. doi: 10.1111/j.1600-0404.2011.01528.x.
372. Finkelstein A., Kunis G., Seksenyan A., Ronen A., Berkutzki T., Azoulay D., Koronyo-Hamaoui M., Schwartz M. Abnormal changes in NKT cells, the IGF-1 axis, and liver pathology in an animal model of ALS. *PLoS One.* 2011;6(8):e22374. doi: 10.1371/journal.pone.0022374.
373. Yazdani S., Seitz C., Cui C., Lovik A., Pan L., Piehl F., Pawitan Y., Kläppe U., Press R., Samuelsson K., Yin L., Vu T.N., Joly A.L., Westerberg L.S., Evertsson B., Ingre C., Andersson J., Fang F. T cell responses at diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis predict disease progression. *Nat Commun.* 2022;13(1):6733. doi: 10.1038/s41467-022-34526-9.
374. Ishii H., Jin X., Ueno M., Tanabe S., Kubo T., Serada S., Naka T., Yamashita T. Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* 2012;3(8):e363. doi: 10.1038/cddis.2012.106.
375. Hammarberg H., Lidman O., Lundberg C., Eltayeb S.Y., Gielen A.W., Muhallab S., Svenningsson A., Lindå H., van Der Meide P.H., Cullheim S., Olsson T., Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci.* 2000;20(14):5283-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-14-05283.2000.

376. Chen Q., Shine H.D. Neuroimmune processes associated with Wallerian degeneration support neurotrophin-3-induced axonal sprouting in the injured spinal cord. *J Neurosci Res.* 2013;91(10):1280-91. doi: 10.1002/jnr.23257.
377. Leone M.A., Mandrioli J., Russo S., Cucovici A., Gianferrari G., Lisnic V., Muresanu D.F., Giuliani F., Copetti M., The Pooled Resource Open-Access Als Clinical Trials Consortium, Fontana A. Neutrophils-to-Lymphocyte Ratio Is Associated with Progression and Overall Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomedicines.* 2022;10(2):354. doi: 10.3390/biomedicines10020354.
378. Wei Q.Q., Hou Y.B., Zhang L.Y., Ou R.W., Cao B., Chen Y.P., Shang H.F. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res.* 2022;17(4):875-880. doi: 10.4103/1673-5374.322476.
379. Choi S.J., Hong Y.H., Kim S.M., Shin J.Y., Suh Y.J., Sung J.J. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts short survival duration in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep.* 2020;10(1):428. doi: 10.1038/s41598-019-57366-y.
380. Nagel G., Peter R.S., Rosenbohm A., Koenig W., Dupuis L., Rothenbacher D., Ludolph A.C. Adipokines, C-reactive protein and Amyotrophic Lateral Sclerosis - results from a population- based ALS registry in Germany. *Sci Rep.* 2017;7(1):4374. doi: 10.1038/s41598-017-04706-5.
381. Beers D.R., Zhao W., Neal D.W., Thonhoff J.R., Thome A.D., Faridar A., Wen S., Wang J., Appel S.H. Elevated acute phase proteins reflect peripheral inflammation and disease severity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep.* 2020;10(1):15295. doi: 10.1038/s41598-020-72247-5.

382. Ryberg H., An J., Darko S., Lustgarten J.L., Jaffa M., Gopalakrishnan V., Lacomis D., Cudkowicz M., Bowser R. Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. *Muscle Nerve*. 2010;42(1):104-11. doi: 10.1002/mus.21683.
383. Huang F., Zhu Y., Hsiao-Nakamoto J., Tang X., Dugas J.C., Moscovitch-Lopatin M., Glass J.D., Brown R.H. Jr, Ladha S.S., Lacomis D., Harris J.M., Scearce-Levie K., Ho C., Bowser R., Berry J.D. Longitudinal biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(7):1103-1116. doi: 10.1002/acn3.51078.
384. de Schaepdryver M., Lunetta C., Tarlarini C., Mosca L., Chio A., Van Damme P., Poesen K. Neurofilament light chain and C reactive protein explored as predictors of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(4):436-437. doi: 10.1136/jnnp-2019-322309.
385. Zhu Y., Li M., Zhang J., Huang X. Association Between C-Reactive Protein and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Front Genet*. 2022;13:919031. doi: 10.3389/fgene.2022.919031.
386. Batty G.D., Kivimäki M., Frank P., Gale C.R., Wright L. Systemic inflammation and subsequent risk of amyotrophic lateral sclerosis: Prospective cohort study. *Brain Behav Immun*. 2023;114:46-51. doi: 10.1016/j.bbi.2023.07.026.
387. Kharel S., Ojha R., Preethish-Kumar V., Bhagat R. C-reactive protein levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *Brain Behav*. 2022;12(3):e2532. doi: 10.1002/brb3.2532.
388. McGrath M.S., Zhang R., Bracci P.M., Azhir A., Forrest B.D. Regulation of the Innate Immune System as a Therapeutic Approach to Supporting Respiratory Function in ALS. *Cells*. 2023;12(7):1031. doi: 10.3390/cells12071031.

389. Gentile F., Maranzano A., Verde F., Bettoni V., Colombo E., Doretta A., Olivero M., Scheveger F., Colombrita C., Bulgarelli I., Spinelli E.G., Torresani E., Messina S., Maderna L., Agosta F., Morelli C., Filippi M., Silani V., Ticozzi N. The value of routine blood work-up in clinical stratification and prognosis of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2024;271(2):794-803. doi: 10.1007/s00415-023-12015-3.
390. Wen T., Zhang Z. Cellular mechanisms of fibrin (ogen): insight from neurodegenerative diseases. *Front Neurosci.* 2023;17:1197094. doi: 10.3389/fnins.2023.1197094.
391. Saul J., Hutchins E., Reiman R., Saul M., Ostrow L.W., Harris B.T., Van Keuren-Jensen K., Bowser R., Bakkar N. Global alterations to the choroid plexus blood-CSF barrier in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):92. doi: 10.1186/s40478-020-00968-9.
392. Garbuzova-Davis S., Hernandez-Ontiveros D.G., Rodrigues M.C., Haller E., Frisina-Deyo A., Mirtyl S., Sallot S., Saporta S., Borlongan C.V., Sanberg P.R. Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res.* 2012;1469:114-28. doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.056.
393. Winkler E.A., Sengillo J.D., Sullivan J.S., Henkel J.S., Appel S.H., Zlokovic B.V. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):111-20. doi: 10.1007/s00401-012-1039-8.
394. Pronto-Laborinho A.C., Lopes C.S., Conceição V.A., Gromicho M., Santos N.C., de Carvalho M., Carvalho F.A. γ' Fibrinogen as a Predictor of Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:715842. doi: 10.3389/fcvm.2021.715842. Erratum in: *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:800151.

395. Xu Z., Jiang J., Xu S., Xie Z., He P., Jiang S., Xu R. Nerve Growth Factor is a Potential Treated Target in Tg(SOD1*G93A)1Gur Mice. *Cell Mol Neurobiol.* 2022;42(4):1035-1046. doi: 10.1007/s10571-020-00993-1. Erratum in: *Cell Mol Neurobiol.* 2021.
396. Ngo S.T., Steyn F.J., Huang L., Mantovani S., Pfluger C.M., Woodruff T.M., O'Sullivan J.D., Henderson R.D., McCombe P.A. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2015;357(1-2):22-7. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.053.
397. Bonini M., Fioretti D., Sargentini V., Del Giacco S., Rinaldi M., Tranquilli C., Bonini S. Increased nerve growth factor serum levels in top athletes. *Clin J Sport Med.* 2013;23(3):228-31. doi: 10.1097/JSM.0b013e31827ee6d5.
398. Ferraiuolo L., Higginbottom A., Heath P.R., Barber S., Greenald D., Kirby J., Shaw P.J. Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2011;134(Pt 9):2627-41. doi: 10.1093/brain/awr193.
399. Kim M.J., Vargas M.R., Harlan B.A., Killoy K.M., Ball L.E., Comte-Walters S., Gooz M., Yamamoto Y., Beckman J.S., Barbeito L., Pehar M. Nitration and Glycation Turn Mature NGF into a Toxic Factor for Motor Neurons: A Role for p75NTR and RAGE Signaling in ALS. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(18):1587-1602. doi: 10.1089/ars.2016.6966.
400. Shi G., Shao S., Zhou J., Huang K., Bi F.F. Urinary p75ECD levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2022;23(5-6):438-445. doi: 10.1080/21678421.2021.1990345.

401. Nishio T., Sunohara N., Furukawa S. Neutrophin switching in spinal motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 1998;9(7):1661-5. doi: 10.1097/00001756-199805110-00073.
402. Deepa P., Shahani N., Alladi P.A., Vijayalakshmi K., Sathyaprabha T.N., Nalini A., Ravi V., Raju T.R. Down regulation of trophic factors in neonatal rat spinal cord after administration of cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neural Transm (Vienna)*. 2011;118(4):531-8. doi: 10.1007/s00702-010-0520-6.
403. Tremolizzo L., Pellegrini A., Conti E., Arosio A., Gerardi F., Lunetta C., Magni P., Appollonio I., Ferrarese C. BDNF Serum Levels with Respect to Multidimensional Assessment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2016;16(3-4):192-8. doi: 10.1159/000441916.
404. Ilzecka J., Stelmasiak Z. Brain-derived neurotrophic factor is not altered in the serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci* 2022;22, 473–474. doi: 10.1007/s100720200009.
405. Riolo G., Ricci C., De Angelis N., Marzocchi C., Guerrera G., Borsellino G., Giannini F., Battistini S. BDNF and Pro-BDNF in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A New Perspective for Biomarkers of Neurodegeneration. *Brain Sci*. 2022;12(5):617. doi: 10.3390/brainsci12050617.
406. Cao M.C., Cawston E.E., Chen G., Brooks C., Douwes J., McLean D., Graham E.S., Dragunow M., Scotter E.L. Serum biomarkers of neuroinflammation and blood-brain barrier leakage in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurol*. 2022;22(1):216. doi: 10.1186/s12883-022-02730-1.

407. Harandi V.M., Gaied A.R., Brännström T., Pedrosa Domellöf F., Liu J.X. Unchanged Neurotrophic Factors and Their Receptors Correlate With Sparing in Extraocular Muscles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(15):6831-6842. doi: 10.1167/iovs.16-20074.
408. Hernández R.G., Silva-Hucha S., Morcuende S., de la Cruz R.R., Pastor A.M, Benítez-Temiño B. Extraocular Motor System Exhibits a Higher Expression of Neurotrophins When Compared with Other Brainstem Motor Systems. *Front Neurosci.* 2017;11:399. doi: 10.3389/fnins.2017.00399.
409. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 1999;52(7):1427-33. doi: 10.1212/wnl.52.7.1427.
410. Ochs G., Penn R.D., York M., Giess R., Beck M., Tonn J., Haigh J., Malta E., Traub M., Sendtner M., Toyka K.V. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(3):201-6. doi: 10.1080/14660820050515197.
411. Wang J., Hu W., Feng Z., Feng M. BDNF-overexpressing human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived motor neurons improve motor function and prolong survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Neurol Res.* 2021;43(3):199-209. doi: 10.1080/01616412.2020.1834775.
412. Duberley R.M., Johnson I.P., Anand P., Leigh P.N., Cairns N.J. Neurotrophin-3-like immunoreactivity and Trk C expression in human spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997;148(1):33-40. doi: 10.1016/s0022-510x(96)00312-7.

413. Harandi V.M., Lindquist S., Kolan S.S., Brännström T., Liu J.X.. Analysis of neurotrophic factors in limb and extraocular muscles of mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014;9(10):e109833. doi: 10.1371/journal.pone.0109833.
414. Müller M.L., Peglau L., Moon L.D.F., Groß S., Schulze J., Ruhnau J., Vogelgesang A. Neurotrophin-3 attenuates human peripheral blood T cell and monocyte activation status and cytokine production post stroke. *Exp Neurol*. 2022;347:113901. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113901.
415. Demel C., Hoegen T., Giese A., Angele B., Pfister H.W., Koedel U., Klein M. Reduced spiral ganglion neuronal loss by adjunctive neurotrophin-3 in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):7. doi: 10.1186/1742-2094-8-7.
416. Liu D.B., Yang J.S., Lu Q.B., Zhu Z.F., Fang Q. Effect of NT-3 on infection-induced memory impairment of neonatal rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(5):2182-2187. doi: 10.26355/eurrev_201903_17264.
417. Beutner C., Lepperhof V., Dann A., Linnartz-Gerlach B., Litwak S., Napoli I., Prinz M., Neumann H. Engineered stem cell-derived microglia as therapeutic vehicle for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gene Ther*. 2013;20(8):797-806. doi: 10.1038/gt.2012.100.
418. Fischer T.C., Lauenstein H.D., Serowka F., Pilzner C., Groneberg D.A., Welker P. Pan-neurotrophin receptor p75NTR expression is strongly induced in lesional atopic mast cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(7):1168-73. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02994.x.

419. Shen W., Zhu L., Lee S.R., Chung S.H., Gillies M.C. Involvement of NT3 and P75(NTR) in photoreceptor degeneration following selective Müller cell ablation. *J Neuroinflammation*. 2013;10:137. doi: 10.1186/1742-2094-10-137.
420. Kiaei M., Petri S., Kipiani K., Gardian G., Choi D.K., Chen J., Calingasan N.Y., Schafer P., Muller G.W., Stewart C., Hensley K., Beal M.F. Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2006;26(9):2467-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5253-05.2006.
421. Elliott J.L. Cytokine upregulation in a murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;95(1-2):172-8. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00242-x.
422. Hensley K., Fedynyshyn J., Ferrell S., Floyd R.A., Gordon B., Grammas P., Hamdheydari L., Mhatre M., Mou S., Pye Q.N., Stewart C., West M., West S., Williamson K.S. Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2003;14(1):74-80. doi: 10.1016/s0969-9961(03)00087-1.
423. Poloni M., Facchetti D., Mai R., Micheli A., Agnoletti L., Francolini G., Mora G., Camana C., Mazzini L., Bachetti T. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2000;287(3):211-4. doi: 10.1016/s0304-3940(00)01177-0.
424. Babu G.N., Kumar A., Chandra R., Puri S.K., Kalita J., Misra U.K. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from

- northern India. *Neurochem Res.* 2008;33(6):1145-9. doi: 10.1007/s11064-007-9564-x.
425. Cereda C., Baiocchi C., Bongioanni P., Cova E., Guareschi S., Metelli M.R., Rossi B., Sbalsi I., Cuccia M.C., Ceroni M. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *J Neuroimmunol.* 2008;194(1-2):123-31. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.10.028.
426. Chen X., Hu Y., Cao Z., Liu Q., Cheng Y. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol.* 2018;9:2122. doi: 10.3389/fimmu.2018.02122.
427. Fukazawa H., Tsukie T., Higashida K., Fujikura M., Ono S. An immunohistochemical study of increased tumor necrosis factor- α in the skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2013;20(10):1371-6. doi: 10.1016/j.jocn.2012.11.007.
428. Tortarolo M., Lo Coco D., Veglianesi P., Vallarola A., Giordana M.T., Marcon G., Beghi E., Poloni M., Strong M.J., Iyer A.M., Aronica E., Bendotti C. Amyotrophic Lateral Sclerosis, a Multisystem Pathology: Insights into the Role of TNF α . *Mediators Inflamm.* 2017;2017:2985051. doi: 10.1155/2017/2985051.
429. Sjoqvist S., Otake K. A pilot study using proximity extension assay of cerebrospinal fluid and its extracellular vesicles identifies novel amyotrophic lateral sclerosis biomarker candidates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;613:166-173. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.127.

430. Lam L., Chin L., Halder R.C., Sagong B., Famenini S., Sayre J., Montoya D., Rubbi L., Pellegrini M., Fiala M. Epigenetic changes in T-cell and monocyte signatures and production of neurotoxic cytokines in ALS patients. *FASEB J.* 2016;30(10):3461-3473. doi: 10.1096/fj.201600259RR.
431. Olesen M.N., Wuolikainen A., Nilsson A.C., Wirenfeldt M., Forsberg K., Madsen J.S., Lillevang S.T., Brandslund I., Andersen P.M., Asgari N. Inflammatory profiles relate to survival in subtypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(3):e697. doi: 10.1212/NXI.0000000000000697.
432. Zhao X., Yang F., Wang H., Cui F., Li M., Sun B., Li Y., Sun Q., He Z., Li Y., Huang X. The increase in CSF total protein and immunoglobulins in Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: A retrospective study. *J Neurol Sci.* 2020;414:116840. doi: 10.1016/j.jns.2020.116840.
433. Apostolski S., Nikolić J., Bugarski-Prokopljević C., Miletić V., Pavlović S., Filipović S. Serum and CSF immunological findings in ALS, *Acta Neurol. Scand.* 1991;83(2):96–98. doi: 10.1111/j.1600-0404.1991.tb04656.x.
434. Sutedja N.A., van der Schouw Y.T., Fischer K., Sizoo E.M., Huisman M.H., Veldink J.H., Van den Berg L.H. Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(6):638-42. doi: 10.1136/jnnp.2010.236752.
435. Mortaz E., Tabarsi P., Jamaati H., Dalil Roofchayee N., Dezfuli N.K., Hashemian S.M., Moniri A., Marjani M., Malekmohammad M., Mansouri D., Varahram M., Folkerts G., Adcock I.M. Increased Serum Levels of Soluble TNF- α Receptor Is Associated With ICU Mortality in COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2021;12:592727. doi: 10.3389/fimmu.2021.592727.

436. Hensley K., Floyd R.A., Gordon B., Mou S., Pye Q.N., Stewart C., West M., Williamson K. Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2002;82(2):365-74. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00968.x. Erratum in: *J Neurochem* 2002;82(6):1570.
437. Marti C.N., Khan H., Mann D.L., Georgiopoulou V.V., Bibbins-Domingo K., Harris T., Koster A., Newman A., Kritchevsky S.B., Kalogeropoulos A.P., Butler J.; Health ABC Study. Soluble tumor necrosis factor receptors and heart failure risk in older adults: Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *Circ Heart Fail*. 2014;7(1):5-11. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000344.
438. Xie J., Van Hoecke L., Vandenbroucke R.E. The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Front Immunol*. 2022;12:796867. doi: 10.3389/fimmu.2021.796867.
439. Fautsch K.J., Block D.R., Graff-Radford J., Wang F., Craver E.C., Hodge D.O., Cutsforth-Gregory J.K., Kilgore K.P., Petersen R.C., Knopman D.S., Flanagan E., Toledano M., Mielke M.M., Bhatti M.T., Chen J.J. Population-Based Evaluation of Total Protein in Cerebrospinal Fluid. *Mayo Clin Proc*. 2023;98(2):239-251. doi: 10.1016/j.mayocp.2022.10.012.