



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«Υπερμικροσκοπική ανάλυση των κινητικών
νευρώνων του νωτιαίου μυελού σε πειραματικό
μοντέλο με νωτιαία μυϊκή ατροφία»**

**«Ultramicroscopic analysis of spinal cord
motoneurons in an experimental model of spinal
muscular atrophy»**

Πτυχιακή Εργασία

Ελισάβετ Μανδώρα του Δημητρίου

Λάρισα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μποζίκη Κλεοπάτρα-Μαρίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας
Τμήματος Ιατρικής, ΑΠΘ (Επιβλέπουσα)

Ψαρρά Άννα-Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Θεοτόκης Πασχάλης Ακαδημαϊκός Υπότροφος και Reader Ιστολογίας-
Εμβρυολογίας Τμήματος Ιατρικής, ΑΠΘ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και στο εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2022-2023.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Σιόγκα – Ράπη Αντωνία, διευθύντρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στα εργαστήρια τους. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω την κα. Μάνθου Μαρία- Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, για τις γνώσεις της που μου πρόσφερε πάνω στο αντικείμενο. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κα. Μεδίτσκου-Ευθυμιάδου Σουλτάνα, Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, για την βοήθειά της και τις συμβουλές της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος να ευχαριστήσω τον κ. Γιώργο Μυγδαλιά, τεχνικό υπεύθυνο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, που μου έδειξε και μου εμπιστεύτηκε τον χειρισμό του μικροσκοπίου και την κα. Φωτεινή για το όμορφο και ήρεμο κλίμα που δημιουργούσε στον χώρο εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα κα. Μποζίκη Μαρίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, για την μοναδική ευκαιρία που μου έδωσε με την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος εργασίας.

Δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω τον κ. Θεοτόκη Πασχάλη, Ακαδημαϊκό Υπότροφο και Reader Ιστολογίας- Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής του ΑΠΘ, για τη συνεχή επίβλεψη, την μύηση στον τρόπο σκέψης για την ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων στην ηλεκτρονική μικροσκοπία αλλά και για την ευχάριστη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Η βοήθεια και οι συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικές για την επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Στην συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Γρηγοριάδη Νικόλαο, Καθηγητή Νευρολογίας της Ιατρικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και Διευθυντή της Β' Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής, για την ευκαιρία να

εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στην ερευνητική του ομάδα, δημιουργώντας πάντα ένα ευχάριστο περιβάλλον.

Ακολουθώς να ευχαριστήσω κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την άψογη συνεργασία μας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής. Αρχικά ευχαριστώ θερμά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα Ευαγγελία Κεσίδου για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές της, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κα Ελένη Γρηγοριάδου για την συνεχή βοήθεια και στήριξή της.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη Καραφουλίδου, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χρυστάλλα Κωνσταντίνου και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ευγενία Κατσίκας που από την πρώτη μέρα ήταν πρόθυμες να με βοηθήσουν, να αντέξουν την γκρίνια μου και να μου χαρίσουν γέλιο εντός και εκτός εργαστηρίου. Επίσης να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Νέλλα καθώς και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ηλία Σαλαμώτα για την υποστήριξή τους και για το ευχάριστο κλίμα. Ακολουθώς την φοιτήτρια Ναταλία Κωνσταντινίδου όπως και την φοιτήτρια Ήρα Ντε Λορέντζο, για τις ευχάριστες στιγμές και την βοήθεια τους.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τον πατέρα μου, την μητέρα μου, τον αδερφό μου και τους φίλους μου για την αγάπη, την στήριξη και την υπομονή τους που μου έδωσαν όλο αυτό το διάστημα, δεν θα μπορούσα να τα είχα καταφέρει χωρίς αυτούς.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	10
1.2 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης.....	10
1.3 Τετροξείδιο του οσμίου	12
1.4 Ουρανύλιο.....	13
1.5 Χρώση Reynolds.....	13
1.6 Νευρικό Σύστημα.....	14
1.7 Μυελίνη.....	15
1.8 Μιτοχόνδρια.....	16
1.9 Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία.....	16
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	19
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1 Πειραματόζωα.....	20
3.1.1 Πιστοποίηση εγκαταστάσεων και συνθήκες διαμονής πειραματόζωων.....	20
3.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο	20
3.1.3 Μοντέλο SMNΔ7	21
3.1.4 Απομόνωση ιστού.....	21
3.2 Διαδικασία μονιμοποίησης.....	22
3.2.1 Μονιμοποίηση Α.....	22
3.2.2 Μονιμοποίηση Β.....	22

3.2.3 Αφυδάτωση.....	23
3.2.4 Διαπότιση	23
3.2.5 Έγκλειση.....	23
3.3 Τομές	24
3.3.1 Ημί-λεπτες	24
3.3.2 Κατασκευή μαχαιριών.....	24
3.3.3 Λεπτές.....	25
3.4 Παρατήρηση	26
3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	26
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
4.1 Αποτελέσματα μελέτης βιοψιών από νωτιαίο μυελό πειραματόζωων αγρίου τύπου και με νωτιαία μυϊκή ατροφία.....	27
4.2 Πυρήνας: φαινόμενο απόπτωσης στους κατώτερους κινητικούς νευρώνες των πρόσθιων κεράτων μυων με NMA.....	27
4.3 Μιτοχόνδρια: φαινόμενο διόγκωσης στα μιτοχόνδρια κινητικών νευρώνων που βρίσκονταν σε διαδικασία απόπτωσης σε μύες με NMA.....	29
4.4 Άξονες: δυσμυελινωμένοι άξονες στην λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού σε μύες με NMA.....	33
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο: Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ) αποτελεί έναν τρόπο ανάλυσης μορφολογικών χαρακτηριστικών με μεγάλη διακριτική ικανότητα ενώ μπορούν να μελετηθούν τα κυτταρικά οργανίδια και η πιθανή παθολογία μιας νόσου. Η νωτιαία μυϊκή ατροφία (NMA) αποτελεί μια νευρομυϊκή διαταραχή που επηρεάζει τους α-κινητικούς νευρώνες των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού.

Υλικά και μέθοδοι: Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό μοντέλο SMNΔ7, το οποίο αναπαράγει αξιόπιστα φαινοτυπικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της NMA τύπου II. Απομονώθηκαν και μονιμοποιήθηκαν για παρατήρηση στο ΗΜΔ, η φαιά και η λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού από NMA μύες και αγρίου τύπου. Συγκρίθηκαν οι πυρήνες, τα μιτοχόνδρια και το πάχος της μυελίνης των αξόνων. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν για στατιστικές διαφορές.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκαν ετεροχρωματικοί πυρήνες σε αποπτωτικούς α-κινητικούς NMA νευρώνες σε σχέση με του αγρίου τύπου οι οποίοι ήταν ως επι το πλείστον ευχρωματικοί. Τα μιτοχόνδρια στην NMA ήταν λιγότερα ($p < 0.001$) και με μικρότερο μέγεθος ($p < 0.001$) συγκριτικά με αυτά αγρίου τύπου ενώ βρέθηκαν και οιδηματώδη μιτοχόνδρια (διογκωμένη μήτρα και ακρολοφίες-αναδιπλώσεις). Τέλος, στην λευκή ουσία των NMA μυών, η μυελίνη των αξόνων ήταν μειωμένη ($p < 0.001$) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεγέθους των αντίστοιχων αξόνων αγρίου τύπου.

Συμπεράσματα: Το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο πιθανολογείται να εμφανίζει και δυσμυελινωτικό φαινότυπο.

ABSTRACT

Background: Transmission electron microscopy (TEM) is a way to analyze morphological features with high resolution. Using transmission electron microscopy gives the opportunity to study cell organelles and their possible pathology due to a disorder such as spinal muscular. Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disorder that affects the α -motor neurons of the spinal cord anterior horns, resulting in muscle atrophy and weakness.

Materials and methods: The widely known experimental model SMND7 is used to study NMA type II, which reliably reproduces phenotypic and pathological features of NMA type II disease. In the present study, gray and white matter of the spinal cord from NMA and wild-type mice were isolated and fixed for TEM. Nuclei, mitochondria, and myelin thickness of axons were compared. Results were analyzed for statistical differences.

Results: In the observation, there were heterochromatic nuclei in apoptotic α -motor NMA neurons and in relation to the wild type, which were mostly euchromatic nuclei. Mitochondria in NMA muscles were fewer ($p \leq 0.001$) and smaller in size ($p < 0.001$) compared to wild-type ones, while mitochondrial swelling (swollen matrix and apical folds) were also found near apoptotic α -motor neurons with NMA. Finally, in the white matter axon, in NMA mice, myelin was reduced ($p < 0.001$) with no statistically significant difference in the size of the corresponding axons between wild type and NMA.

Conclusion: This experimental model is also likely to display a dysmyelinating phenotype.

1. Εισαγωγή

1.1 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΗΜ), που πιο σωστά θα έπρεπε να ονομάζεται ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επειδή η ακτινοβολία που χρησιμοποιεί είναι επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια, εφευρέθηκε το 1931 και δεν απαιτεί την σήμανση συγκεκριμένων επιτόπων με κάποια χρωμογόνο ουσία προκειμένου να ληφθούν ολοκληρωμένες εικόνες των κυτταρικών οργανιδίων σε υψηλή ανάλυση (Ravi et al., 2020). Οι δύο βασικές τεχνικές ΗΜ μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ) και την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (ΗΜΣ) (Wolff & Bárcena, 2021). Στο ΗΜΣ, μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων μεταδίδεται κατά μήκος του δείγματος. Τα ηλεκτρόνια που αναπηδούν πίσω από την επιφάνεια χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μιας εικόνας που παρέχει τοπογραφικές πληροφορίες για το δείγμα. Στο ΗΜΔ, οι εικόνες σχηματίζονται από ηλεκτρόνια που διέρχονται και αλληλεπιδρούν με το δείγμα (Ravi et al., 2020). Το ΗΜΣ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερα μεγέθους δείγματα. Από την άλλη πλευρά το ΗΜΔ λόγω του περιορισμένου βάθους της διείσδυσης της δέσμης των ηλεκτρονίων, τα δείγματα πρέπει να είναι σχετικά λεπτά (όχι περισσότερο από 300 nm) (Wolff & Bárcena, 2021).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υπερσχύει του οπτικού μικροσκοπίου και λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας μεγέθυνσης αλλά κυρίως λόγω της μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας. Ο οφθαλμός έχει διακριτική ικανότητα στα 0.3 mm και το οπτικό μικροσκόπιο έχει 200 nm που ισούται με 2000 Ångström ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$). Η διακριτική ικανότητα του ΗΜ είναι 2 Å και μπορεί να φτάσει έως και 0.5 Å.

Σύμφωνα με τη θεωρία του De Broglie, το μήκος κύματος λ των ηλεκτρονίων υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\lambda = 0.1 \frac{150}{V} \quad (1)$$

όπου V είναι η τάση επιτάχυνσης των σωματιδίων σε Volts και λ το μήκος κύματος των επιταχυνμένων ηλεκτρονίων. Έτσι για μια τάση επιτάχυνσης 80 kV, το μήκος κύματος λ γίνεται $\lambda=0.004$ nm.

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{A} \quad (2)$$

σύμφωνα με τον τύπο (2), όπου (A) είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού, η διακριτική ικανότητα (d) γίνεται περίπου 0.15 nm (Champness, 2001).

1.2 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης

Στο ΗΜΔ (Εικόνα 1) μία δέσμη ηλεκτρονίων ομοιογενούς πυκνότητας ρεύματος χρησιμοποιείται για την ακτινοβολία ενός λεπτού δείγματος (για να διαπερνά σε ποσοστό 50-90% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας το δείγμα, θα πρέπει να είναι αρκετά λεπτό. Η πηγή ηλεκτρονίων βρίσκεται στο επάνω μέρος μιας στήλης κενού και τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από μια κάθοδο με τρεις τρόπους: με εκπομπή τύπου Schottky, με εκπομπή πεδίου ή με θερμιονική εκπομπή.

Η πηγή ηλεκτρονίων μπορεί να είναι είτε ένα νήμα βολφραμίου (θερμιονική εκπομπή) είτε μια λεπτή μεταλλική ακίδα παρουσία ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (εκπομπή πεδίου) και στις δύο περιπτώσεις εκπέμπονται ηλεκτρόνια, μέσω της πυράκτωσης, όταν περάσει από αυτά ηλεκτρικό ρεύμα (Egerton, 2005).

Μεταξύ της ανόδου και της καθόδου εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού με τη βοήθεια ηλεκτροδίων υψηλής τάσης με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της εκπεμπόμενης δέσμης ηλεκτρονίων. Στην συνέχεια, με τη βοήθεια δυο συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών, ελέγχεται η εστίαση της δέσμης ηλεκτρονίων και η ελάττωση της περιοχής του δείγματος που φωτίζεται χωρίς αντίστοιχη ελάττωση στην φωτεινότητα. Η εστίαση, δηλαδή η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από αυτούς τους δύο ηλεκτρομαγνητικούς φακούς που μεταβάλλοντας την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους, αλλάζει και η ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει και έτσι εστιάζεται η δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα. Οι φακοί είναι ηλεκτρομαγνητικά πηνία που περνάνε κατά μήκος του άξονα τους τα ηλεκτρόνια. Για να ελαχιστοποιούνται οι συγκρούσεις των ηλεκτρονίων με τα μόρια του αέρα στη περιοχή

των μαγνητικών φακών διατηρείται το κενό της τάξης του 10^{-7} έως 10^{-4} mbar. Στο επίπεδο που βρίσκεται το δείγμα γίνεται η εστίαση της δέσμης, σε μια περιορισμένη περιοχή λίγων τετραγωνικών μικρομέτρων. Το δείγμα εισάγεται στο μικροσκόπιο μέσω ειδικής κατασκευής που εξασφαλίζει τη διατήρηση του κενού. Σύμφωνα με τα κρυσταλλικά χαρακτηριστικά του δείγματος, τα ηλεκτρόνια που περνάνε από αυτό περιθλώνται σε διαφορετικές γωνίες, ακολουθώντας τον νόμο του Bragg. Απευθείας κάτω από το δείγμα βρίσκεται ο αντικειμενικός φακός που διαμορφώνει την περίθλαση μακρινού πεδίου του δείγματος η οποία αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier των κρυσταλλικών χαρακτηριστικών του. Η απεικόνιση του αντικειμένου μπορεί να είτε εικόνα περίθλασης είτε είδωλο το οποίο δίνει την δυνατότητα μελέτης της κρυσταλλικής μορφής του. Με την βοήθεια ενός ενδιάμεσου φακού σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο είδωλο το οποίο μέσω ενός φακού προβολής, μετά από μια τελευταία μεγέθυνση, στέλνεται σε οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία (ZnS, θειούχος ψευδάργυρος). Στο τέλος παίρνουμε είτε την εικόνα περίθλασης είτε το μεγεθυμένο είδωλο, για φωτογράφιση και παρατήρηση. Τις εικόνες αυτές μπορούμε να τις παρατηρήσουμε είτε στην οθόνη του μικροσκοπίου αλλά μπορούμε να τις απεικονίσουμε και με ειδικές φωτογραφικές μηχανές που είναι ενσωματωμένες στο μικροσκόπιο. Τα σημερινά μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένες ψηφιακές κάμερες και υπολογιστές που δίνουν την δυνατότητα να γίνει άμεσα η ψηφιοποίηση και αποθήκευση της εικόνας (Rose, 2016).



Εικόνα 1: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (ΗΜΔ).

1.3 Τετροξείδιο του οσμίου

Το τετροξείδιο του οσμίου (OsO_4) χρησιμοποιείται ως επιπρόσθετο μονιμοποιητικό αντιδραστήριο στο ΗΜΔ σταθεροποιώντας τα λιπίδια των μεμβρανών μετά την γλουταραλδεύδη η οποία μονιμοποιεί ως επί το πλείστον τις πρωτεΐνες (και κάποια σάκχαρα). Ειδικότερα, το OsO_4 οξειδώνει τους ακόρεστους δεσμούς των λιπαρών οξέων και το ίδιο ανάγεται σε μεταλλικό όσμιο που έχει μαύρο χρώμα και είναι ηλεκτρονικά πυκνό και έτσι προσδίδει επιπλέον αντίθεση στο δείγμα (Kiyoto et al., 2022).

Όμως το OsO_4 , όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι αρκετά τοξικό και ευαίσθητο στο φως και άρα χρήζει ιδιαίτερο χειρισμό. Επιπλέον το OsO_4 απαιτεί προσοχή στον χρόνο έκθεσης με τον ιστό καθώς μπορεί να προκαλέσει την παραμόρφωση του.

1.4 Ουρανύλιο

Οι πιο ευρέως γνωστές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι τα βαρέα μέταλλα, το ουρανύλιο και ο μόλυβδος. Η μέθοδος αντίθεσης-αντίχρωσης (negative staining) στις λεπτές τομές με οξικό ουρανύλιο (UA) και κιτρικό μόλυβδο (διάλυμα Reynolds) είναι η τυπική μέθοδος αντίθεσης για την ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Η πρώτη αναφορά χρήσης του ουρανυλίου για χρώση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγινε από τον Watson το 1958 (Watson, 1958). Το UA υπερτερεί των άλλων μετάλλων όσον αφορά την χρώση καθώς παράγει την υψηλότερη πυκνότητα ηλεκτρονίων και δίνει την καλύτερη αντίθεση εικόνας, αλλά και προσδίδει ευκρίνεια στην εικόνα ακόμα και σε μεγάλες μεγεθύνσεις, λόγω του ατομικού βάρους ($AB=238$). Τα ιόντα ουρανυλίου συνδέονται με πρωτεΐνες και λιπίδια που φέρουν καρβοξυλικές ομάδες σιαλικού οξέος όπως γλυκοπρωτεΐνες και γαγγλιοσίδη αλλά επίσης συνδέονται και σε ομάδες φωσφορικού νουκλεϊκού οξέος όπως DNA και RNA. Οι γαγγλιοσίδες είναι γλυκοσφιγγολιπίδια και έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις στην κυτταρική μεμβράνη. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι επίσης άφθονες σε όλες τις μεμβράνες και είναι μέρος του γλυκοκάλυκα. Συνεπώς, το UA δίνει καλά αποτελέσματα αντίθεσης για μεμβράνες, νουκλεϊκά οξέα και ριβοσώματα που περιέχουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Παρόλα αυτά το ουρανύλιο είναι ευαίσθητο στο φως και ειδικά στην υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα ένα εκτεθεί σε αυτή να προκαλείται ίζημα στο διάλυμα ενώ το ίδιο μπορεί να συμβεί και με το πέρασμα του χρόνου. Επιπλέον το UA είναι τόσο ραδιενεργό όσο και τοξικό, με τα εμπορικά αποθέματα που παρασκευάζονται από απεμπλουτισμένο ουράνιο έχουν τυπική ραδιενέργεια 0,37–0,51 $\mu\text{Ci/g}$. Αυτό το επίπεδο ραδιενέργειας είναι ήπιο και δεν είναι αρκετό για να προκαλέσει βλάβη σε ζωντανό ιστό (Pandithage, 2013).

1.5 Χρώση Reynolds

Ο κιτρικός μόλυβδος χρησιμοποιείται για την χρώση Reynolds καθώς ενισχύει την αντίθεση σε διάφορες κυτταρικές δομές όπως τα ριβοσώματα, οι λιπιδικές μεμβράνες, ο κυτταροσκελετός και άλλα συστατικά του κυτταροπλάσματος. Η αντίθεση αυξάνεται ανάλογα με την αλληλεπίδραση με το όσμιο το οποίο δίνει την δυνατότητα στα ιόντα του μολύβδου να προσκολληθούν στις πολικές ομάδες των μορίων. Το όσμιο

χρησιμοποιήθηκε νωρίτερα στην διαδικασία της μονιμοποίησης. Σε μικρότερη ένταση ο μόλυβδος αλληλεπιδρά και με το ουρανύλιο για αυτό και η χρώση Reynolds ακολουθεί αυτής με το ουρανύλιο.

Ο κιτρικός μόλυβδος οξειδώνεται εύκολα με την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα, είτε από τον αέρα είτε και από το νερό που απαιτείτε για την προετοιμασία του. Ο ανθρακικός μόλυβδος ($PbCO_3$) είναι αδιάλυτος στο νερό και δημιουργεί τοξικό λευκό ίζημα και δεν μπορεί να διαλυθεί στο νερό, ενώ στο δείγμα δημιουργεί μαύρα στίγματα. Τέλος όλα τα άλατα μολύβδου όπως και ο κιτρικός μόλυβδος είναι εξαιρετικά τοξικά.

Τα διαλύματα μολύβδου όπως και αυτά του ουρανυλίου χρειάζονται συγκεκριμένη τιμή pH για να δώσουν το βέλτιστο αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά τα διαλύματα μολύβδου, σε αντίθεση με το ουρανύλιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολύ υψηλές τιμές pH (>12 pH).

Τα αλκαλικά διαλύματα μολύβδου Wenable & Goggeshalls και Reynold είναι τα πιο γνωστά. Από αυτές τις δύο μεθόδους, η Reynolds (1963) είναι η πιο διαδεδομένη για εργασίες ρουτίνας καθώς η ποιότητα του εμπορικού κιτρικού μολύβδου δεν αντιστοιχεί πάντα στην ποιότητα που απαιτείται για τη χρώση. Στη μέθοδο Reynolds, ο κιτρικός μόλυβδος αποτελεί προϊόν αντίδρασης μεταξύ του κιτρικού νατρίου και του νιτρικού μολύβδου.

Όλες οι χρώσεις αλκαλικού μολύβδου μπορούν να θεωρηθούν ρυθμιστικά διαλύματα. Επομένως, αυτά τα διαλύματα είναι κατάλληλα για εμπορικές χρήσεις, υπό την προϋπόθεση ότι παρασκευάζονται κάτω από συνθήκες που δεν επιτρέπουν τον σχηματισμό ανθρακικού μολύβδου (Pandithage, 2013).

1.6 Νευρικό Σύστημα

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), αποτελούμενο από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ), αποτελούμενο από τα γάγγλια και τα περιφερικά νεύρα, που βρίσκονται στην περιφέρεια. Τα κύρια νευρικά κύτταρα (νευρώνες) έχουν τρεις μορφολογικά καθορισμένες περιοχές: το κυτταρικό σώμα που αποτελεί το κέντρο μεταβολισμού του κυττάρου, τους δενδρίτες που λειτουργούν ως εξειδικευμένες δομές υποδοχής ερεθισμάτων και τον νευράξονα που αποτελεί την κύρια μονάδα αγωγής της ώσης. Τα νευρογλοιακά κύτταρα είναι περίπου ίσα σε αναλογία (ανάλογα με την

περιοχή) με τα νευρικά στο ΚΝΣ (Herculano-Houzel, 2009) και έχουν αρκετούς ζωτικούς ρόλους, όπως η στήριξη, η μεταβολική υποστήριξη, η ρύθμιση και διατήρηση της συγκέντρωσης των ιόντων στον εξωκυττάριο χώρο, η παραγωγή μυελίνης και η εκκαθάριση τοξινών για τους νευρώνες μεταβολιτών ή παθογόνων παραγόντων.

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες νευρογλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα επενδυματικά κύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Τα ολιγοδενδροκύτταρα στην λευκή ουσία συμβάλλουν στην μυελίνωση ενώ στην φαιά ουσία έχει δειχθεί τελευταία πως δίνουν την απαιτούμενη στήριξη περιβάλλοντας το κυτταρικό σώμα των νευρώνων (Rothstein & Levison, 2005). Στο ΠΝΣ τα κύτταρα Schwann είναι υπεύθυνα για να μονώνουν τους νευράξονες σχηματίζοντας τα έλυτρα μυελίνης. Τα αστροκύτταρα που αποτελούν τα πιο πολλά από τα νευρογλοιακά κύτταρα, συμμετέχουν στον σχηματισμό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ο οποίος ελέγχει τη μεταφορά ουσιών από και προς το ΚΝΣ. Στην λευκή ουσία τα αστροκύτταρα είναι χαρακτηριστικά ινώδη γεγονός που τα διακρίνει από τα πρωτοπλασματικά κύτταρα που βρίσκονται στη φαιά ουσία. Τα επενδυματικά κύτταρα καλύπτουν τις εγκεφαλικές κοιλίες και το κεντρικό κανάλι του νωτιαίου μυελού που περιέχουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) αλλά διευκολύνουν και την διακίνησή του με τους κροσσούς που φέρουν (Kandel et al., 1996).

1.7 Μυελίνη

Η μυελίνη περιβάλλει τους άξονες των νευρικών κυττάρων και επιτελεί διάφορους ρόλους. Αρχικά προστατεύει και μονώνει τον άξονα ενώ παράλληλα βοηθά και στην ενίσχυση της ταχύτητας μεταγωγής της ώσης μεταξύ των νευρώνων. Στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) σχηματίζεται από τα κύτταρα Schwann, με κάθε κύτταρο να σχηματίζει ένα περίβλημα μυελίνης γύρω από έναν άξονα, ενώ στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) από τα ολιγοδενδροκύτταρα, με κάθε κύτταρο να σχηματίζει πολλαπλά περιβλήματα γύρω από διαφορετικούς άξονες (Salzer & Zalc, 2016). Τα κύτταρα Schwann περιβάλλουν κατά σειρά το μήκος του νευράξονα, αφήνοντας αμύελα διαστήματα τους κόμβους του Ranvier. Η σύσταση της μυελίνης είναι 70% λιπίδια και 30% πρωτεΐνες, εκ των οποίων στο ΚΝΣ η βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP) και η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη της μυελίνης (PLP) είναι οι πιο άφθονες (Simons & Nave, 2016). Οι βασικές πρωτεΐνες μυελίνης αποτελούν την ομάδα πρωτεϊνών που βρίσκεται στην μυελίνη τόσο στο ΠΝΣ όσο και στο ΚΝΣ (Kandel et

al., 1996). Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος ενός κοινού πρόδρομου mRNA, οι βασικές πρωτεΐνες μυελίνης έχουν τουλάχιστον επτά συγγενείς πρωτεΐνες (Aschner & Toews, 2010).

1.8 Μιτοχόνδρια

Το μιτοχόνδριο αποτελεί κυτταρικό οργανίδιο των ευκαρυωτικών κυττάρων και περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Γενικά έχει πολύ σημαντικό ρόλο για την λειτουργία του κυττάρου και θεωρούνται «εργοστάσια ενέργειας» καθώς είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεγάλου ποσοστού της ενέργειας ή ATP που χρειάζεται το κύτταρο για την σωστή λειτουργία του (Annesley & Fisher, 2019). Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα, σε σχέση με άλλες ομάδες κυττάρων, στα μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα κ.α. επειδή αυτές οι ομάδες χρειάζονται παραπάνω ενέργεια. Εκτός από την παραγωγή ενέργειας, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν και στην κυτταρική σηματοδότηση με την αποθήκευση ασβεστίου, στην παραγωγή θερμότητας, στην κυτταρική ανάπτυξη και στον κυτταρικό θάνατο. Έχουν το δικό τους γονιδίωμα (mtDNA) το οποίο αντιγράφεται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του κυττάρου (Andrieux et al., 2021).

1.9 Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία (NMA) είναι μια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό των α-κινητικών νευρώνων των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού και επακόλουθη μυϊκή ατροφία και αδυναμία. Το πιο κοινό μοντέλο της NMA κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο που προκύπτει από ομόζυγη διαγραφή ή μετάλλαξη του γονιδίου SMN1 το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q13 (Kolb & Kissel, 2015), η κλινική βαρύτητα συσχετίζεται με τον αριθμό των αντιγράφων ενός σχεδόν πανομοιότυπου γονιδίου, του SMN2 (Arnold & Fischbeck, 2018). Τα δύο αυτά γονίδια είναι υπεύθυνα για την έκφραση της Survival Motor Neuron (SMN) πρωτεΐνης (Lefebvre et al., 1995).

Η σοβαρότητα της NMA είναι εξαιρετικά μεταβλητή και τα κλινικά χαρακτηριστικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριους φαινοτύπους με βάση την ηλικία έναρξης και τη μέγιστη δυνατή κινητική λειτουργία (Kolb & Kissel, 2015). Ο Τύπος 1 είναι ο πιο σοβαρός και προσβάλλει κυρίως τα νεογέννητα, οι τύποι 2 και 3 είναι ενδιάμεσοι τύποι ενώ ο τύπος 4 είναι ο πιο ήπιος τύπος για τους ενήλικες (Arnold &

Fischbeck, 2018). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η σοβαρότητα της νόσου σχετίζεται με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου SMN2, και άρα των επιπέδων της πρωτεΐνης SMN (Campbell et al., 1997; Elsheikh et al., 2009; Wirth et al., 1999). Έτσι τα νεογέννητα με τύπο 1 NMA έχουν συνήθως 2 ή 3 αντίγραφα, ενώ με τύπο 2 NMA έχουν συνήθως 3 αντίγραφα. Στον τύπο 3 της NMA έχουν 3 με 4 αντίγραφα και στον τύπο 4 έχουν συνήθως 4 αντίγραφα ή περισσότερα (Arnold & Fischbeck, 2018; Lefebvre et al., 1995; Lorson et al., 1998).

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της NMA είναι η υπόταση, η έντονη μυϊκή αδυναμία στα κάτω άκρα, μυϊκή ατροφία και η αναπνευστική δυσλειτουργία (Tizzano & Finkel, 2017). Ο τύπος 1 ή αλλιώς νόσος Werdnig-Hoffmann, που αντιπροσωπεύει το 50% των περιπτώσεων και τα συμπτώματα παρουσιάζονται κατά τους πρώτους 6 μήνες ζωής των νεογνών εμφανίζοντας μυϊκή αδυναμία, που επηρεάζει την αναπνευστική τους λειτουργία και τελικά τα περισσότερα μωρά δεν ζουν για περισσότερο από τα 2 έτη λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας (Schroth, 2009; Wang et al., 2007). Παράλληλα η μυϊκή αδυναμία επηρεάζει την κίνησή τους και την ικανότητα κατάποσης, έχουν παντελή αδυναμία στήριξης της κεφαλής και δεν μπορούν ποτέ να καθίσουν αυτόνομα (Farrar et al., 2013; Zerres & Rudnik-Schöneborn, 1995). Το ασθενές κλάμα και η ελάχιστη πρόσληψη τροφής έχουν ως αποτέλεσμα την έλλειψη φυσιολογικής ανάπτυξης (Zerres & Rudnik-Schöneborn, 1995).

Στον τύπο 2 της NMA, η οποία έχει συχνότητα εμφάνισης 20% των ασθενών με NMA, με τον εντοπισμό των συμπτωμάτων συνήθως μεταξύ 6 ως 18 μηνών. Η αδυναμία παρατηρείται σε όλο το σώμα, αλλά είναι πιο έντονη στα κάτω άκρα και τα αντανakλαστικά απουσιάζουν στα άτομα αυτά. Τα άτομα με αυτόν τον τύπο της νόσου μπορούν να καθίσουν μόνα τους στην αρχή της ζωής τους αλλά είναι συνήθως η υποβοηθούμενη βάδιση. Επιπλέον υπάρχει η αναπνευστική δυσχέρεια και η δυσκολία μάσησης και κατάποσης όπως και στον τύπο 1. Σε όλα τα άτομα με NMA τύπου 2 είναι παρούσα η σκολίωση. Με την πρόοδο της έρευνας και τη σωστή φροντίδα των ατόμων αυτών, είναι δυνατόν να επιβιώσουν έως και 25 χρόνια ή και περισσότερο (Arnold & Fischbeck, 2018; Farrar et al., 2013).

Ο τύπος 3 ή αλλιώς νόσος Kugelberg-Welander, που αντιπροσωπεύει το 30% των περιπτώσεων, παρουσιάζει συμπτώματα μυϊκής αδυναμίας ποικίλης βαρύτητας και ένα σημαντικό ποσοστό των ατόμων αυτών καθίσταται καθηλωμένο σε αναπηρικό

αμαξίδιο και παρουσιάζει σκελετικές παραμορφώσεις. Παρόλα αυτά αρκετά άτομα που νοσούν με τον τύπο 3 της NMA πριν εξελιχθεί αρκετά η ασθένεια επιτυγχάνουν όλα τα βασικά ορόσημα της κινητικής ανάπτυξης και είναι σε θέση να περπατήσουν ανεξάρτητα. Ο τύπος αυτός έχει δύο υπότυπους που διαχωρίζονται ανάλογα με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων: τον τύπο 3α στον οποίο τα συμπτώματα εμφανίζονται πριν από την ηλικία των 3 ετών, και τον τύπο 3β, στον οποίο τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά την ηλικία των 3 ετών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα άτομα με τους τύπους 2 και 3 εισέρχονται στην ενήλικη ζωή με διαφορετικό βαθμό αναπηρίας και συχνά παρουσιάζουν σταδιακή εξέλιξη (Duong et al., 2021).

Ο τύπος 4, που αντιπροσωπεύει ποσοστό μικρότερο από 5% των περιπτώσεων, έχει συμπτώματα που αρχίζουν μετά την ηλικία των 18. Τα άτομα με NMA τύπου 4 είναι αυτόνομα μέχρι τα 60 τους έτη. Το προσδόκιμο ζωής τους είναι το παρόμοιο με των υγιών ανθρώπων (Kolb & Kissel, 2015). Επιπλέον υπάρχει άλλος ένας τύπος της NMA, ο τύπος 0 στον οποίο τα συμπτώματα αρχίζουν στη μήτρα κατά την εμβρυϊκή περίοδο και κατά τη γέννηση υπάρχει σοβαρή αδυναμία με συμφόρηση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της χρήσης ανοσοτροποποιητικών θεραπειών, η διαχώριση με βάση την ηλικία έναρξης τείνει να ωθείται από την εμφάνιση νέων φαινοτύπων. Βάση αποτελεσμάτων από κλινικές δοκιμές, φαίνεται πως τα άτομα των οποίων τα κλινικά συμπτώματα ανιχνεύονται έως την ηλικία των έξι μηνών και ταξινομούνται ως NMA τύπου 1 μπορεί να μετατραπούν σε NMA τύπου 2 με ανεξάρτητη στήριξη του κορμού, εάν αντιμετωπιστεί αρκετά νωρίς. Παράλληλα ο αριθμός αντιγράφων SMN2 και η ηλικία έναρξης φαρμακευτικής αγωγής θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη, αντί να αλλάζει η ταξινόμηση με βάση αποκλειστικά την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων (Schorling et al., 2020). Επίσης άλλα συμπτώματα της NMA είναι η καρδιακή νόσος, μη φυσιολογικός μεταβολισμός λιπαρών οξέων και δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Bach, 2007; Crawford et al., 1999; Rudnik-Schöneborn et al., 2008; Tein et al., 1995). Τέλος, η προγεννητική έκφραση των πρωτεϊνών SMN στα περισσότερα όργανα υποδηλώνει ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα (Novelli et al., 1997).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διπλωματική αποσκοπεί στην διερεύνηση της παθοφυσιολογίας της ΝΜΑ χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο, SMNΔ7, το οποίο προσομοιώνει τον τύπο II της ανθρώπινης ασθένειας. Πρώτος στόχος, ήταν η παρατήρηση της μορφολογίας του κυτταρικού σώματος των κινητικών νευρώνων που πάσχουν στη φαιά ουσία των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού αλλά και η ταυτόχρονη ποσοτική ανάλυση των κυτταρικών στοιχείων του νευρώνα, όπως ο αριθμός και το μέγεθος των μιτοχονδρίων. Δεύτερος στόχος, ήταν η παρατήρηση των αξόνων στην λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού, καθώς δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, για τον έλεγχο πιθανών μορφολογικών αλλοιώσεων στα τελικά στάδια της νόσου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματόζωα

3.1.1 Πιστοποίηση εγκαταστάσεων και συνθήκες διαμονής πειραματοζώων.

Για την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έγινε χρήση θηλυκών και αρσενικών διαγονιδιακών μυών της φυλής FVB, ηλικίας έως 14 ημερών που αποτελεί και το τελικό στάδιο της NMA. Η φυλή FVB επιτρέπει στους ερευνητές να διεξάγουν συμπεράσματα για τον ανθρώπινο οργανισμό και έτσι είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σε ζωικά πειραματικά μοντέλα της NMA. Τα πειραματόζωα προήλθαν από το ερευνητικό κέντρο «The Jackson Laboratory» Charles River Italy και διατηρήθηκαν σε ειδικές εγκαταστάσεις ασφάλειας επιπέδου 3 (animal care house, P3) στο αδειοδοτημένο Εργαστήριο Ανάπτυξης - Εκτροφής Ζωικών Προτύπων και Βιοϊατρικής Έρευνας της Σχολής Επιστημών Υγείας στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ (EL-54-BIOexp-10), σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ (Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων / αρ.1374/11) και την Ελληνική Κυβερνητική Νομοθεσία. Στις εγκαταστάσεις υπήρχαν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των μυών: εναλλαγή ημέρα-νύχτας ανά 12 ώρες, ελεύθερη πρόσβαση σε ειδική αποστειρωμένη τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα και αποστειρωμένο νερό χωρίς αντιβιοτικά.

Ο χειρισμός των μυών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Επιτροπής Δεοντολογίας στην Έρευνα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου αναφορικά με την προστασία των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (2010/63) ακολουθούμενες από συμμόρφωση σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία και το Προεδρικό διάταγμα υπ' αριθμό 56 (56/2013).

3.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Για την ολοκλήρωση της τρέχουσας διπλωματικής εργασίας έγινε έλεγχος και ταυτοποίηση του γονότυπου των μυών και εφαρμόστηκε ελεγχόμενο σύστημα διασταυρώσεων. Δύο αρσενικοί μύες παρέμεναν σε διασταύρωση για μια βδομάδα με ένα θηλυκό μυ και μετά οι αρσενικοί μύες απομακρύνονταν από το θηλυκό. Η κύηση

είχε διάρκεια 20 έως 30 ημέρες και μετά τη γέννηση τα νεογνά απογαλακτίζονταν στις 20 ημέρες ή νωρίτερα (14 ημέρες) για την εκτέλεση των πειραμάτων.

3.1.3 Μοντέλο SMNΔ7

Ο άνθρωπος είναι ο μόνος οργανισμός με δύο γονίδια που εμπλέκονται στην έκφραση της SMN πρωτεΐνης, το SMN1 και το SMN2 που εδράζονται στο χρωμόσωμα 5q (5q11.2-5q13.3) (Rao et al., 2018). Για αυτό τον λόγο οι επιστήμονες έχουν χρησιμοποιήσει μια ποικιλία προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένης της αποσιώπησης ενδογενών γονιδίων και της δημιουργίας διαγονιδιακών ζώων με πρόσθετα αντίγραφα του ανθρώπινου γονιδίου SMN2.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό μοντέλο SMNΔ7 το οποίο προσομοιώνει τον τύπο II NMA. Συγκεκριμένα, είναι τριπλά διαγονιδιακά πειραματόζωα FVB.Cg-Grm7Tg(SMN2)89Ahmb Smn1tm1Msd Tg(SMN2*delta7)4299Ahmb/J, τα οποία εκτρέφονται και προμηθεύονται από το ερευνητικό κέντρο «The Jackson Laboratory», Charles River, Italy. Ένα επιπλέον αντίγραφο του ανθρώπινου γονιδίου SMN2 (Tg(SMN2)89) προστέθηκε στα διαγονιδιακά πειραματόζωα, στο χρωμόσωμα 6, υπό τη δράση του υποκινητή grm7 (glutamate receptor metabotropic 7), απενεργοποιώντας το ενδογενές γονίδιο SMN το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13. Επιπλέον, σε τυχαίες θέσεις του γονιδιώματος προστέθηκαν 14 αντίγραφα της ανθρώπινης αλληλουχίας SMN2 cDNA (Tg(SMN2*delta7)4299Ahmb) που βρίσκονται υπό τον έλεγχο ανθρώπινου υποκινητή. Από την αλληλουχία αυτή απουσιάζει το εξόνιο 7 με αποτέλεσμα να παράγεται η ισομορφή SMNΔ7 της πρωτεΐνης SMN.

3.1.4 Απομόνωση ιστού

Η θυσία των πειραματοζώων έγινε στο τελικό στάδιο της νόσου, δηλαδή στην 13^η μέρα. Η μέθοδος που ακολουθείται για την θυσία εξαρτάται από το είδος της ανάλυσης που θα ακολουθήσει. Στην ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται η μονιμοποίηση με διάλυμα γλουταραλδεύδης 2.5 % και παραφορμαλδεύδης 2%.

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τρία πειραματόζωα αγρίου τύπου και τρία του μοντέλου SMNΔ7. Αρχικά τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν σε περιβάλλον κορεσμένο με αιθέρα και η εκτίμηση της αναισθησίας έγινε με έλεγχο του αντανακλαστικού της κινητικότητας των δακτύλων

των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων μετά από πίεσή τους. Στην συνέχεια θυσιάστηκαν και έγινε συλλογή του νωτιαίου μυελού από την περιοχή L1 έως L5, από την οποία απομονώθηκε η φαιά και λευκή ουσία για κάθε πειραματόζωο.

3.2 Διαδικασία μονιμοποίησης

3.2.1 Μονιμοποίηση Α

Το δείγμα του ιστού που απομονώθηκε, εμβαπτίστηκε σε διάλυμα: γλουταραλδεύδη 2.5 %, παραφορμαλδεύδη 2% (pH 7.4) αμέσως μετά την λήψη της βιοψίας ώστε να επιτευχθεί η ακαριαία μονιμοποίησή του. Η πρώτη μονιμοποίηση έγινε στο παραπάνω διάλυμα για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε έκπλυση και αποθήκευση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 4°C.

3.2.2 Μονιμοποίηση Β

Τα επόμενα βήματα ολοκληρώθηκαν με τα δείγματα μέσα σε γυάλινα σκούρα δοχεία, καθώς το τετροξειδίο του οσμίου (OsO_4) είναι ένα πολύ τοξικό υλικό ευαίσθητο στο φως, στο μέταλλο και το πλαστικό.

Σε κάθε δοχείο το δείγμα εμβαπτίστηκε σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M για 5 λεπτά, για 3 συνεχόμενες φορές, αντικαθιστώντας κάθε φορά το ρυθμιστικό διάλυμα με νέο. Η δεύτερη μονιμοποίηση έγινε με αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος με διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου 1% (αρχικά 4% αλλά έγινε αραίωση σε 1 ml απιονισμένο νερό και 2 ml ρυθμιστικό διάλυμα 0.2M/ 3ml του OsO_4 1% προστέθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθησε εμβάπτιση των δειγμάτων με 0.1 M διάλυμα οξικού νατρίου για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 4°C.

Τέλος, έγινε αντικατάσταση του διαλύματος οξικού νατρίου με 1% διάλυμα οξικού ουρανυλίου για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.3 Αφυδάτωση

Η αφαίρεση του νερού από τα κύτταρα γίνεται σταδιακά και αντικαθίσταται με αιθυλική αλκοόλη. Η αφυδάτωση έγινε με υδατικά διαλύματα αλκοόλης αυξανόμενης βαθμιαίας συγκέντρωσης (25%, 50%, 70%, 95% και 100%) για 10 min σε κάθε μία. Τα δείγματα εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα αλκοόλης 100% για 10 λεπτά, 3 συνεχόμενες φορές, αντικαθιστώντας κάθε φορά το διάλυμα αλκοόλης με νέο.

3.2.4 Διαπότιση

Η μετάβαση από τον ελεύθερο νερού αλλά γεμάτο αλκοόλη ιστό, στη φάση της ρητίνης (Εικόνα 2), γίνεται και πάλι σταδιακά. Οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε προπυλενοξείδιο για 15 λεπτά, 2 συνεχόμενες φορές, αντικαθιστώντας κάθε φορά το διάλυμα με νέο. Ακολούθησε εμπότιση κάθε ιστού σε 3ml αραιωμένου προπυλενοξειδίου σε ρητίνη με αναλογία 1:1 όλη την νύχτα με σύγχρονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δοχείο με τον ιστό έμεινε ανοιχτό για να εξατμιστεί οποιοδήποτε περισσευούμενο υγρό.



Εικόνα 2: Οι δύο φάσεις κατά την διάρκεια παρασκευής της ρητίνης.

3.2.5 Έγκλειση

Για την έγκλειση των ιστών έγινε αντικατάσταση του προπυλενοξειδίου – ρητίνη με σκέτη ρητίνη για 2 ώρες, 2 συνεχόμενες φορές, αντικαθιστώντας κάθε φορά την ρητίνη με νέα. Ακολούθησε έγκλειση των δειγμάτων με ρητίνη και τοποθέτηση σε ειδικές

αριθμημένες θέσεις (Εικόνα 3) για παραμονή στον κλίβανο για 48 ώρες σε θερμοκρασία 60°C.



Εικόνα 3: Η ειδική αριθμημένη θήκη για εγκλεισμό των δειγμάτων με ρητίνη (αριστερά). Τα μπλοκάκια ρητίνης με τον ιστό να διακρίνεται με σκούρο χρώμα στην κορυφή τους (δεξιά).

3.3 Τομές

3.3.1 Ημί-λεπτες (semi-thin sections)

Η ρητίνη μετά την επώαση σε θερμοκρασία 60°C έχει πολυμεριστεί και τα δείγματα του ιστού μπορούν να κοπούν στο υπερμικροτόμο. Η προετοιμασία των ιστών για μελέτη στο ΗΜΔ αρχίζει με την απομάκρυνση της περιττής ρητίνης με ξυράφι (trimming) στον πυραμιδοτόμο και έπονται οι ημίλεπτες τομές της πυραμίδας στον υπερμικροτόμο, για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Η αδρή χρώση των τομών γίνεται με toluidine blue ώστε να αναγνωριστεί ο προσανατολισμός του ιστού βάση των κεχρωσμένων δομών. Οι τομές γίνονται με ειδικά «μαχαίρια» (φτιαγμένα από διαμάντι ή γυαλί) και αποτελεί ένα απαραίτητο στάδιο για να εντοπίσουμε το μέρος του ιστού, που θα μελετήσουμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

3.3.2 Κατασκευή γυάλινων μαχαiriών

Ειδική ράβδος καθαρίζεται με απεσταγμένο νερό και την αφήνουμε να στεγνώσει σε χώρο χωρίς σκόνη. Στην συνέχεια κόβουμε την ράβδο σε τετράγωνα με το ειδικό

μηχάνημα κατασκευής μαχαιριών (Reichert Knifemaker), προσέχοντας οι ανώμαλες ακμές της ράβδου να είναι προς τα κάτω. Έπειτα στρίβουμε κάθε τετράγωνο 45° αριστερόστροφα και μετά το σπάσιμο, παίρνουμε δύο τριγωνικά μαχαίρια.

3.3.3 Λεπτές (ultra-thin sections)

Τα καλά μαχαίρια δηλαδή αυτά με καλή ποιότητα της ακμής κοπής χρησιμοποιούνται για την λήψη λεπτών τομών. Αυτό πραγματοποιείτε με την κατασκευή της «βάρκας» με αυτοκόλλητη ταινία, στεγανοποίηση με λιωμένο κερί και γεμίζοντάς την με απεσταγμένο νερό στο οποίο επιπλέουν οι τομές που κόβονται (Εικόνα 4). Το πάχος των τομών ήταν 600-900 Angstrom και αναγνωρίζονταν από το χρώμα τους καθώς επέπλεαν στο απεσταγμένο νερό. Οι τομές συλλέγονται με αντικειμενοφόρα πλέγματα διαμέτρου 3.1 mm (200 τετραγώνων). Για την χρώση των τομών που προσδιορίζονται για παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται η διπλή χρώση πρώτα με οξικό ουρανύλιο 5% για 20 min, τις ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό και τις επαναχρωματίζουμε με κιτρικό μόλυβδο (διάλυμα Reynolds) για 20 min.



Εικόνα 4: Φωτογραφία μέσα από το φακό του υπερμικροτόμου. Διακρίνονται κάτω αριστερά η «βάρκα» με τις χρυσές τομές στην επιφάνεια του νερού και πάνω αριστερά το μπλοκάκι με τον ιστό στην κορυφή του.

3.4 Παρατήρηση – απόκτηση φωτογραφικού υλικού

Η παρατήρηση των τομών έγινε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Jeol Jem-1011 ενώ η φωτογράφιση με την κάμερα ES500W Erlangshen και το μοντέλο 782.

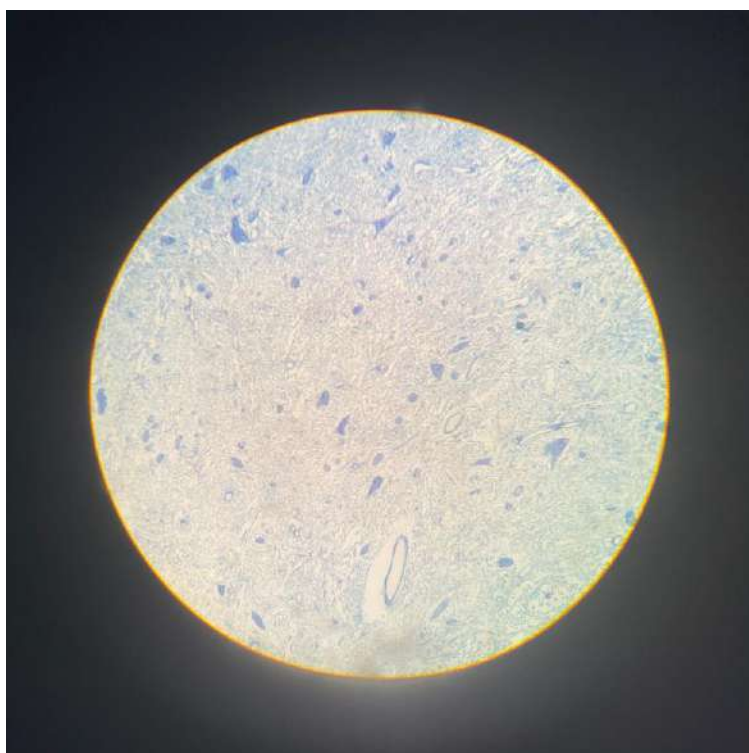
3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Όλα τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην τρέχουσα διπλωματική εργασία εκφράζονται υπό τη μορφή Μέσου Όρου $\pm$ Τυπικό Σφάλμα Μέσου (μ.ο. $\pm$ ΤΣΜ). Η στατιστική επεξεργασία όλων των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ειδικού στατιστικού προγράμματος Graph Pad Prism 8 εφαρμόζοντας την κατάλληλη στατιστική δοκιμασία. Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο $p < 0.05$, εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά. Για τη σύγκριση μεταξύ των πειραματικών ομάδων χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική δοκιμασία Student t-test.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα μελέτης ιστού από νωτιαίο μυελό πειραματόζωων αγρίου τύπου και με νωτιαία μυϊκή ατροφία.

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία μελετήθηκαν : το περικάρυο/κυτταρικό σώμα (πυρήνες και τα μιτοχόνδρια) στην φαιά ουσία και οι άξονες στην λευκή ουσία των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού, σε μύες αγρίου τύπου και με νωτιαία μυϊκή ατροφία (NMA). Η αδρή εκτίμηση έγινε στις ημίλεπτες με χρώση Toluidine blue (Εικόνα 5).

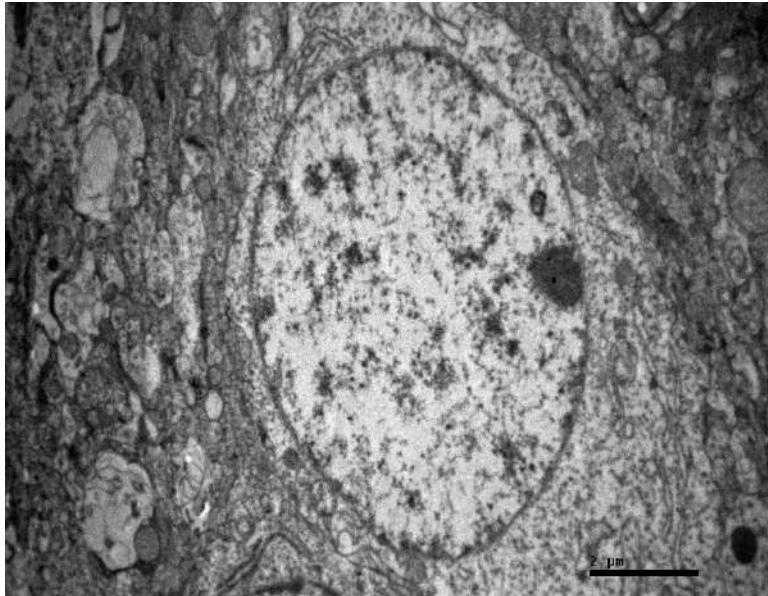


Εικόνα 5: Νευροπίλημα στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε μυ με NMA. Διακρίνονται με έντονο μπλε οι πυρήνες των κινητικών νευρώνων.

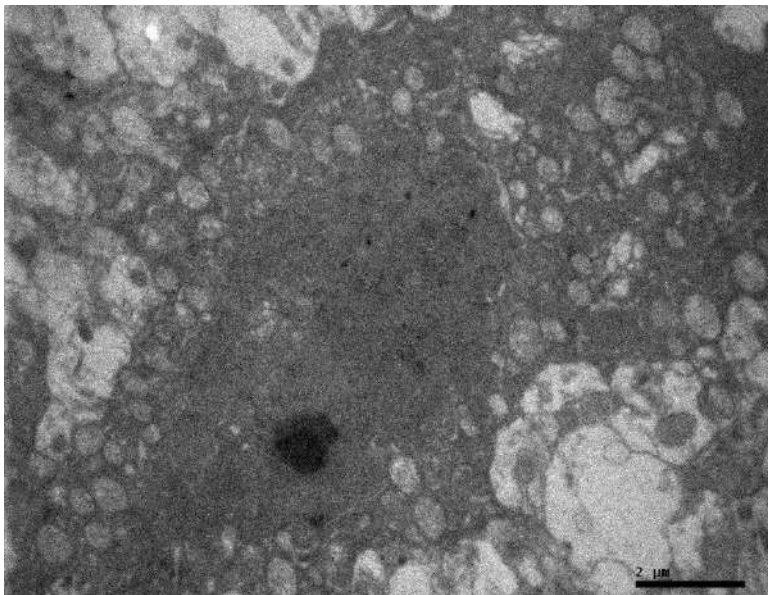
4.2 Πυρήνας: φαινόμενο απόπτωσης στους κατώτερους κινητικούς νευρώνες των πρόσθιων κεράτων μυών με NMA

Στην περιοχή των κατώτερων κινητικών νευρώνων των πρόσθιων κεράτων μυών με νωτιαία μυϊκή ατροφία παρατηρήθηκαν αποπτωτικοί νευρώνες. Ειδικότερα η διαφορά εντοπίστηκε στην μορφολογία του πυρήνα και των κυτταρικών στοιχείων του σώματος: στους μύες με NMA ο πυρήνας ήταν ως επί το πλείστον ετεροχρωματικός (συμπυκνωμένη χρωματίνη) ενώ ο φυσιολογικός πυρήνας των κατώτερων κινητικών

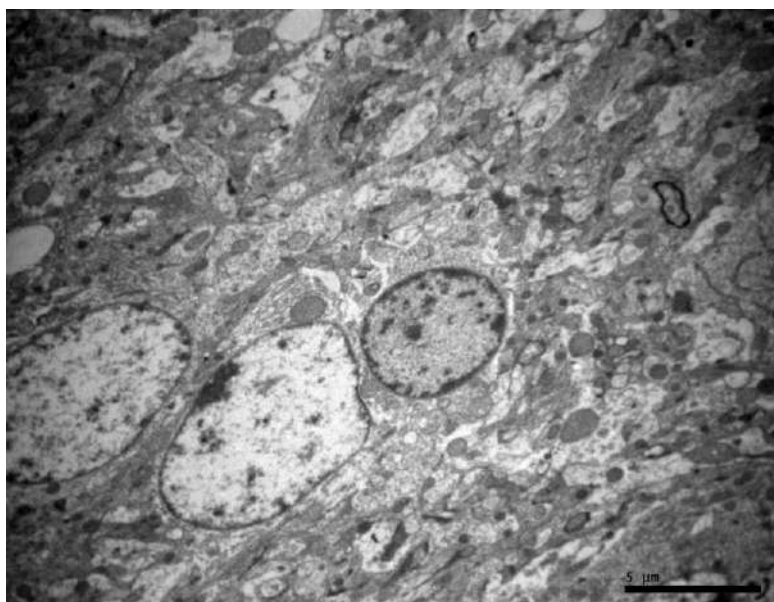
νευρώνων εμφανιζόταν ευχρωματικός στα παρασκευάσματα που εξετάστηκαν από μύες αγρίου τύπου. Το κυτταρικό σώμα των NMA νευρώνων ήταν επίσης ηλεκτρονικά πυκνό με φυσαλιδώδη εμφάνιση κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, σε σχέση με το υγιές κύτταρο αγρίου τύπου.



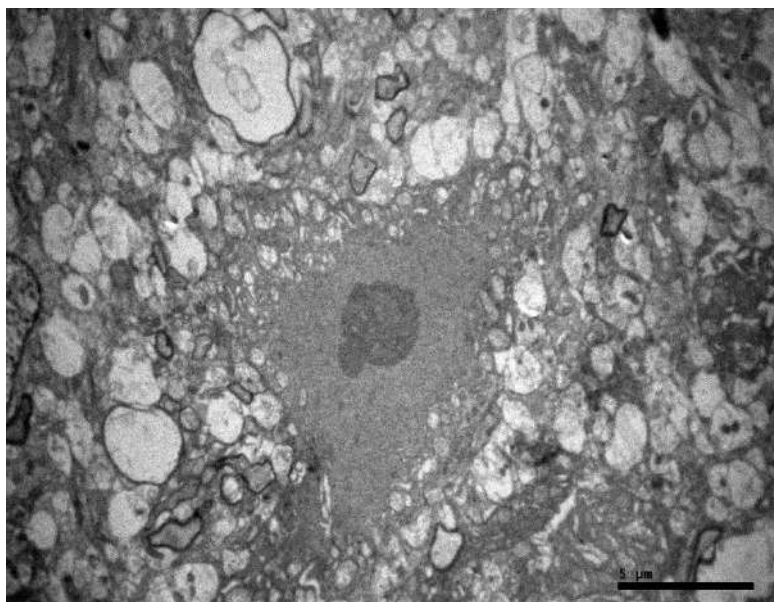
Εικόνα 6: Πυρήνας κινητικού νευρώνα στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε μυ αγρίου τύπου. Η μεγάλη σκούρη κουκίδα αντιπροσωπεύει τον πυρηνίσκο του. Κλίμακα = 2μm.



Εικόνα 7: Αποπτωτικός κινητικός νευρώνας στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε μυ με νωτιαία μυϊκή ατροφία. Η μεγάλη σκούρη κουκίδα αντιπροσωπεύει τον πυρηνίσκο του. Κλίμακα = 2μm



Εικόνα 8: Πυρήνες κινητικών νευρώνων στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε μυ αγρίου τύπου. Κλίμακα = 5μm

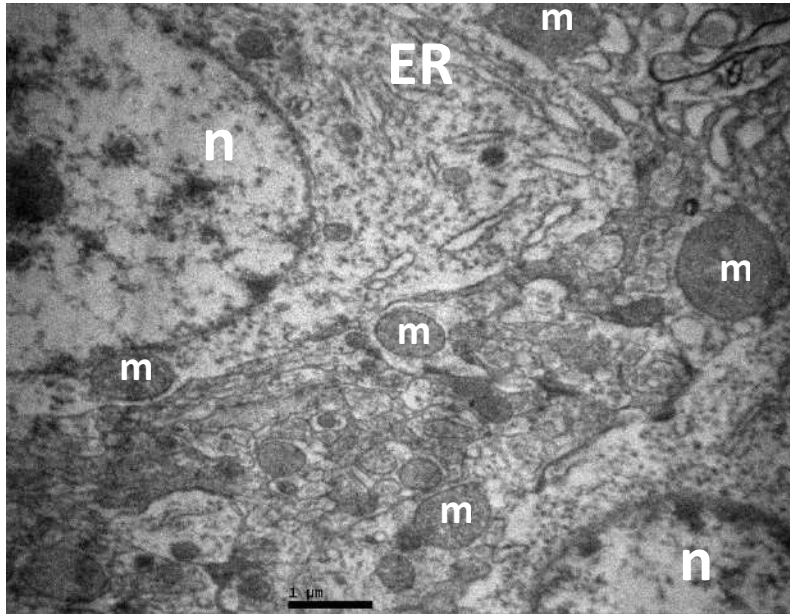


Εικόνα 9: Αποπτωτικός πυρήνας κινητικού νευρώνα στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού σε μυ με νωτιαία μυϊκή ατροφία. Κλίμακα = 5μm

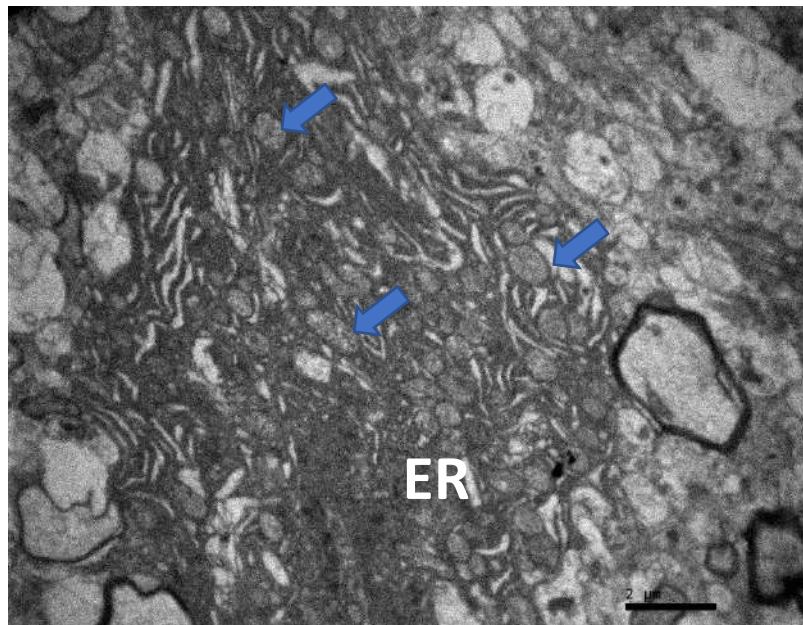
4.3 Μιτοχόνδρια: φαινόμενο διόγκωσης στα μιτοχόνδρια κινητικών νευρώνων που βρίσκονταν σε διαδικασία απόπτωσης σε μύες με NMA

Στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού μύων αγρίου τύπου τα μιτοχόνδρια είχαν μεγαλύτερο μέγεθος ($0.6837 \pm 0.02319 \mu\text{m}$) σε σχέση με τα μιτοχόνδρια στην φαιά

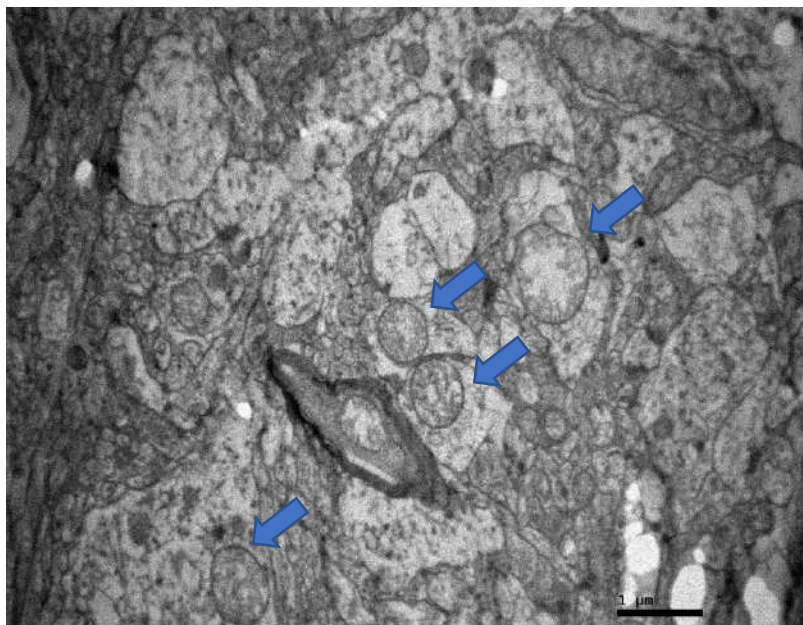
ουσία μυών με NMA ($0.3269 \pm 0.01665 \mu\text{m}$, $p < 0.001$, Διάγραμμα 1). Παράλληλα ο αριθμός των μιτοχονδρίων στην φαιά ουσία του νωτιαίου μυελού μυών αγρίου τύπου ήταν μεγαλύτερος (0.4146 ± 0.02415 μιτοχόνδρια / μm^2) σε σχέση με τον αριθμό των μιτοχονδρίων στην φαιά ουσία μυών με NMA (0.2703 ± 0.03204 μιτοχόνδρια / μm^2 , $p = 0.001$, Διάγραμμα 2). Τα μιτοχόνδρια κινητικών νευρώνων που βρίσκονταν σε διαδικασία απόπτωσης σε μύες με NMA εμφανίστηκαν με διογκωμένη μήτρα και ακρολοφίες-αναδιπλώσεις (Εικόνα 11).



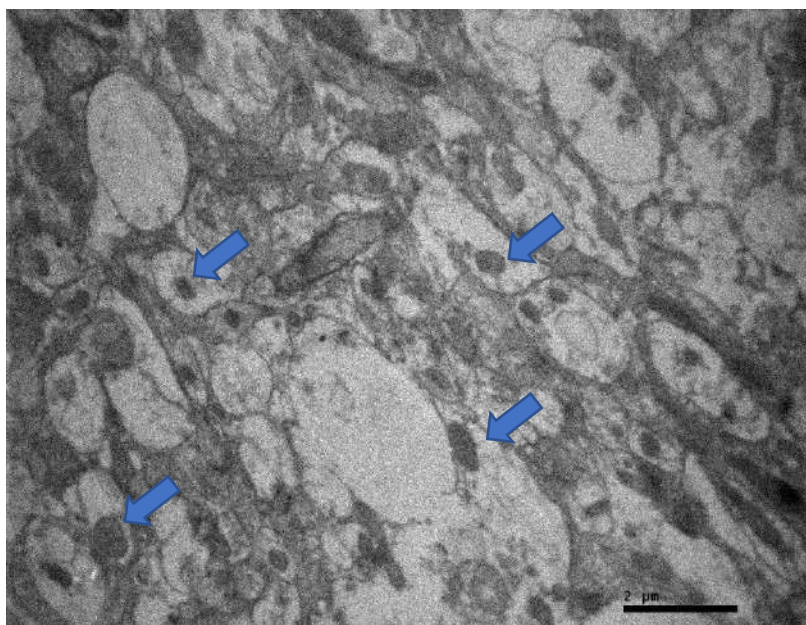
Εικόνα 10: Κυτταρικά στοιχεία νευρικών κυττάρων σε μυ αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα διακρίνονται τμήμα του πυρήνα (n), τα μιτοχόνδρια (m), το κυτταρόπλασμα, μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και στοιχεία του κυτταροσκελετού. Κλίμακα = $1\mu\text{m}$



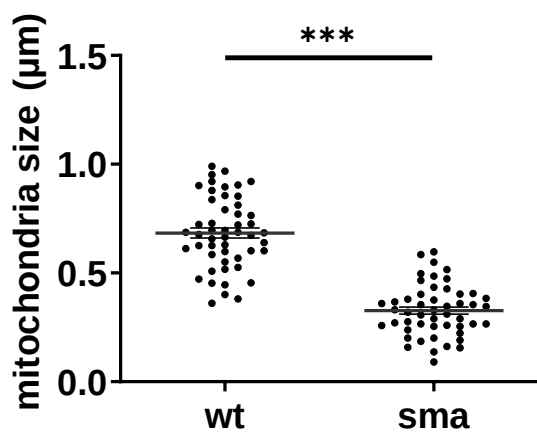
Εικόνα 11: Νευροπίλημα, κινητικός νευρώνας σε απόπτωση και άξονες σε μυ με NMA. Εμφανές είναι το ηλεκτρονικά πυκνό κυτταρόπλασμα με τα οίδηματώδη μιτοχόνδρια (βέλη) στο κινητικό νευρώνα που βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης. Κλίμακα = 2μm



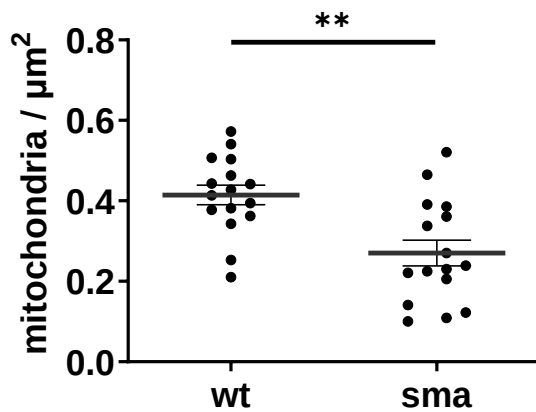
Εικόνα 12: Νευροπίλημα και τα μιτοχόνδρια (βέλος) σε μυ αγρίου τύπου. Κλίμακα = 1μm.



Εικόνα 13: Νευροπίλημα και μιτοχόνδρια (βέλος) εμφανώς μικρότερα με ηλεκτρονικά πυκνή μήτρα σε ποντίκια NMA. Κλίμακα = 2μm



Διάγραμμα 1: Η διαφορά μεγέθους των μιτοχονδρίων σε μύες αγρίου τύπου και με NMA. Ο μέσος αριθμός της διαμέτρου μιτοχονδρίων αγρίου τύπου ήταν $0.6837 \pm 0.02319 \mu\text{m}$. Ενώ ο μέσος αριθμός της διαμέτρου μιτοχονδρίων NMA ήταν $0.3269 \pm 0.01665 \mu\text{m}$, *** $p < 0.001$.

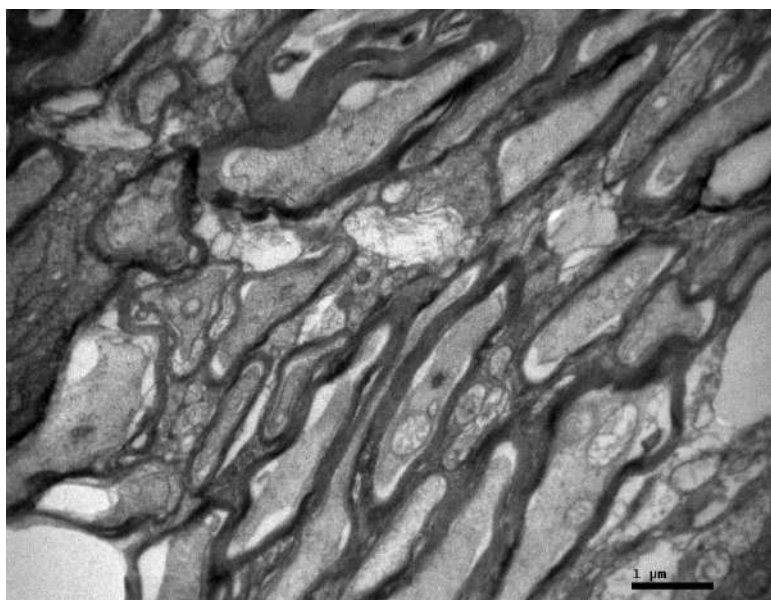


Διάγραμμα 2: Η διαφορά του αριθμού των μιτοχονδρίων σε μύες αγρίου τύπου και με NMA. Ο μέσος αριθμός των μιτοχονδρίων αγρίου τύπου ήταν 0.4146 ± 0.02415 μιτοχόνδρια / μm^2 . Ενώ ο μέσος αριθμός των μιτοχονδρίων NMA ήταν 0.2703 ± 0.03204 μιτοχόνδρια / μm^2 , $**p = 0.001$.

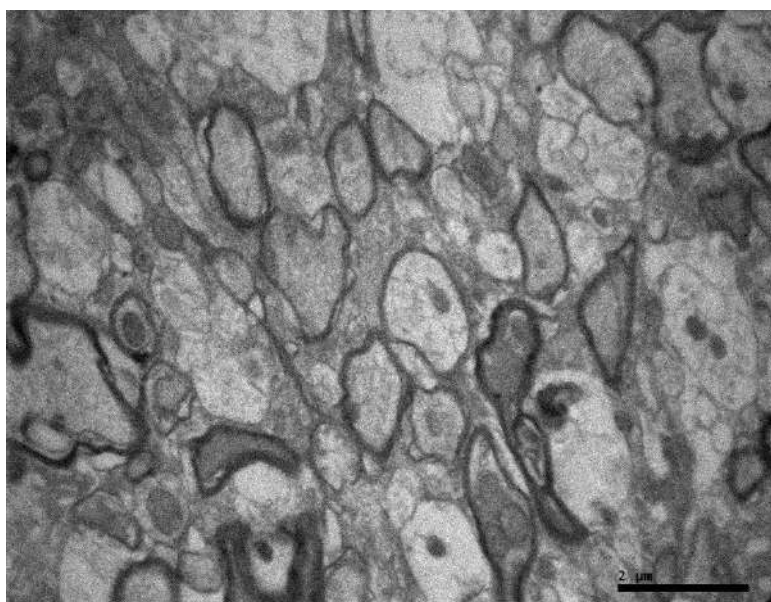
4.4 Άξονες: δυσμυελινωμένοι άξονες στην λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού σε μύες με NMA

Στην λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού παρατηρήθηκαν δυσμυελινωμένοι άξονες σε μύες με NMA. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο μέγεθος των αξόνων μεταξύ μυών αγρίου τύπου ($0.4452 \pm 0.01036 \mu\text{m}$) και μυών με NMA ($0.4312 \pm 0.01038 \mu\text{m}$, Διάγραμμα 4).

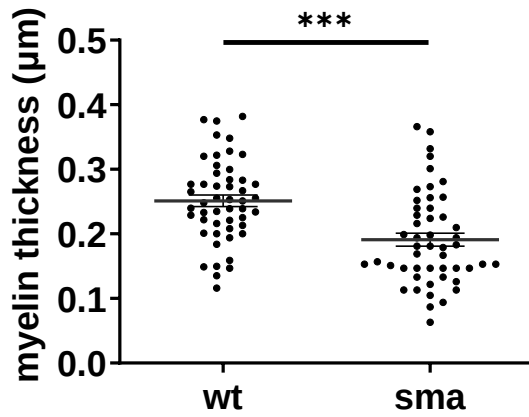
Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μικρότερο πάχος μυελίνης στους άξονες σε μύες με NMA ($0.1909 \pm 0.01006 \mu\text{m}$) έναντι του πάχους της μυελίνης στους άξονες σε μύες αγρίου τύπου ($0.2511 \pm 0.008985 \mu\text{m}$, $p < 0.001$, Διάγραμμα 3).



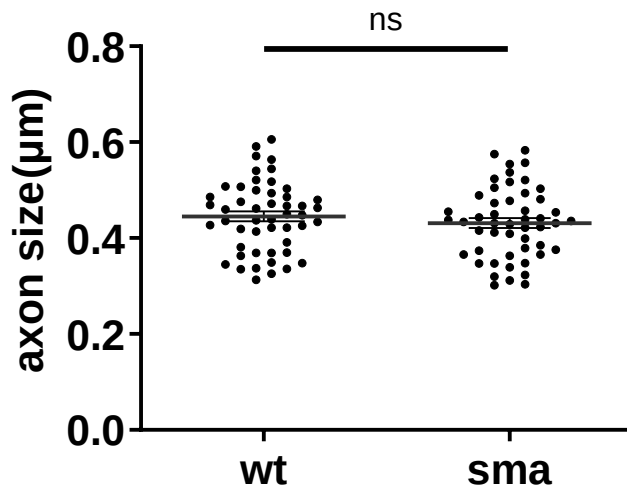
Εικόνα 14: Άξονες στην λευκή ουσία στον νωτιαίο μυελό σε μυ αγρίου τύπου. Κλίμακα = 1 μm



Εικόνα 15: Άξονες στην λευκή ουσία στον νωτιαίο μυελό σε μυ με NMA. Διακρίνονται δυσμυελινωμένοι άξονες. Κλίμακα = 2 μm .



Διάγραμμα 3: Η διαφορά του πάχους της μυελίνης σε μύες αγρίου τύπου και με NMA. Ο μέσος αριθμός του πάχους της μυελίνης αγρίου τύπου ήταν $0.2511 \pm 0.008985 \mu\text{m}$. Ενώ ο μέσος αριθμός του πάχους της μυελίνης NMA ήταν $0.1909 \pm 0.01006 \mu\text{m}$, *** $p < 0.001$.



Διάγραμμα 4: Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεγέθους των αξόνων σε μύες αγρίου τύπου και με NMA. Ο μέσος αριθμός της διαμέτρου αξόνων αγρίου τύπου ήταν $0.4452 \pm 0.01036 \mu\text{m}$. Ενώ ο μέσος αριθμός της διαμέτρου αξόνων NMA ήταν $0.4312 \pm 0.01038 \mu\text{m}$, ns = non-significant.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία στο νωτιαίο μυελό μυών αγρίου τύπου και με NMA. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν στην φαιά ουσία τα κυτταρικά σώματα και στην λευκή ουσία οι άξονες των α-κινητικών νευρώνων των πρόσθιων κεράτων. Ειδικότερα στους μυες με NMA παρατηρήθηκε το φαινόμενο της απόπτωσης στους νευρώνες, επηρεάζοντας και τα μιτοχόνδρια, αφού βρέθηκαν οιδηματώδη μιτοχόνδρια και τέλος, στους άξονες παρατηρήθηκε το φαινόμενο της δυσμυελίνωσης.

Η διαφορετική κατανομή της χρωματίνης στον πυρήνα αντιστοιχεί τον βαθμό της μεταγραφικής δραστηριότητας του κυττάρου. Στους κατώτερους κινητικούς νευρώνες των μυών με NMA διαπιστώθηκε το φαινόμενο της απόπτωσης και ειδικότερα ότι ο πυρήνας τους ήταν κυρίως ετεροχρωματικός, δηλαδή συμπυκνωμένη χρωματίνη που αφορά μεταγραφικά ανενεργό DNA. Αντιθέτως ο πυρήνας των κατώτερων κινητικών νευρώνων από μύες αγρίου τύπου, ήταν ευχρωματικός κάτι που υποδηλώνει ενεργά μεταγραφόμενο DNA. Αυτή η παρατήρηση μαζί με το ηλεκτρονικά πυκνό κυτταρικό σώμα αντικατοπτρίζουν την μεταβολική δραστηριότητα των α-κινητικών νευρώνων στην NMA.

Η συνθήκη αυτή επιβεβαιώθηκε και από την παρατήρηση των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, στους αποπτωτικούς κινητικούς νευρώνες εντοπίστηκαν μιτοχόνδρια που παρουσίαζαν οίδημα με διογκωμένη μήτρα και ακρολοφίες-αναδιπλώσεις, επιβεβαιώνοντας ευρήματα που υποστηρίζουν πως οι μορφολογικές αλλοιώσεις των μιτοχονδρίων συμβάλλουν στην παθογένεια της NMA και δεν αποτελούν αποτέλεσμα αυτής (Miller et al., 2016). Διαφορετικά ευρήματα αναφέρουν πως τα οιδηματώδη μιτοχόνδρια είναι ένας κεντρικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης που εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του ATP, με την διόγκωση των μιτοχονδρίων να συμβαίνει κυρίως λόγω του ανοίγματος πόρων και αύξησης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (Javadov et al., 2018).

Παρόλο αυτού του φαινομένου, ο αριθμός των μιτοχονδρίων ήταν μικρότερος στους μυες με NMA από ότι σε αυτούς αγρίου τύπου, εύρημα που συμφωνεί και με την βιβλιογραφία (Miller et al., 2016) ενώ και η διάμετρος των μιτοχονδρίων ήταν μικρότερη στους μυες με NMA. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με την παθολογία

της NMA και δείχνουν μειωμένη παραγωγή ενέργειας και γενικότερης μειωμένης λειτουργίας των κινητικών νευρώνων.

Όσον αφορά τους άξονες παρατηρήθηκε μικρότερο πάχος μυελίνης σε μυες με NMA σε σχέση με αυτούς αγρίου τύπου. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η μεταγραφή και η μετάφραση πρωτεϊνών, που συμμετέχουν στην μυελίνωση των αξόνων του νωτιαίου μυελού, ήταν μειωμένη στην NMA (Murray et al., 2010; Ohuchi et al., 2019). Όμως με επιπλέον μέτρηση της διαμέτρου των αξόνων σε μυες αγρίου τύπου αλλά και με NMA δεν βρέθηκε διαφορά, κάτι που δείχνει πως δεν υπάρχει απομυελίνωση ή κάποια αλλοίωση της μυελίνης σε μετέπειτα στάδια της νόσου. Συνεπώς πιθανολογείται ότι το μοντέλο εμφανίζει δυσμυελίνωση στον φαινότυπό του, εύρημα που δεν αναφέρεται στην βιβλιογραφία και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συνοψίζοντας, με την παρούσα διπλωματική εργασία σκιαγραφήθηκε η υπερμικροσκοπική παθολογία της NMA αναδεικνύοντας τόσο το φαινόμενο απόπτωσης των α-κινητικών νευρώνων όσο και την μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα που ανέδειξαν οι εκάστοτε μετρήσεις των μιτοχονδριακών αναλύσεων. Όμως κάτι που δεν είναι γνωστό για την παθολογία της NMA και εμφανίστηκε στην παρούσα εργασία είναι ο δυσμυελινωτικός φαινότυπος που μπορεί να εμφανίζει το συγκεκριμένο μοντέλο της NMA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrieux, P., Chevillard, C., Cunha-Neto, E., & Nunes, J. P. S. (2021). Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11338. <https://doi.org/10.3390/ijms222111338>
- Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2019). Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, 8(7), 680. <https://doi.org/10.3390/cells8070680>
- Arnold, E. S., & Fischbeck, K. H. (2018). Chapter 38—Spinal muscular atrophy. In D. H. Geschwind, H. L. Paulson, & C. Klein (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 148, pp. 591–601). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7>
- Aschner, M., & Toews, A. D. (2010). 13.11—Myelin and Myelination*. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 181–198). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01312-9>
- Bach, J. R. (2007). Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 86(5), 349–355. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31804b1d66>
- Campbell, L., Potter, A., Ignatius, J., Dubowitz, V., & Davies, K. (1997). Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: Implications for disease process and clinical phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 61(1), 40–50.
- Champness, P. E. (2001). *Electron diffraction in the transmission electron microscope*. BIOS Scientific Publishers.
- Crawford, T. O., Sladky, J. T., Hurko, O., Besner-Johnston, A., & Kelley, R. I. (1999). Abnormal fatty acid metabolism in childhood spinal muscular atrophy.

Annals of Neurology, 45(3), 337–343. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199903\)45:3<337::aid-ana9>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199903)45:3<337::aid-ana9>3.0.co;2-u)

- Duong, T., Wolford, C., McDermott, M. P., Macpherson, C. E., Pasternak, A., Glanzman, A. M., Martens, W. B., Kichula, E., Darras, B. T., De Vivo, D. C., Zolkipli-Cunningham, Z., Finkel, R. S., Zeineh, M., Wintermark, M., Sampson, J., Hagerman, K. A., Young, S. D., & Day, J. W. (2021). Nusinersen Treatment in Adults With Spinal Muscular Atrophy. *Neurology: Clinical Practice*, 11(3), e317–e327. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000001033>
- Egerton, R. F. (2005). *Physical principles of electron microscopy: An introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer.
- Elsheikh, B., Prior, T., Zhang, X., Miller, R., Kolb, S. J., Moore, D., Bradley, W., Barohn, R., Bryan, W., Gelinas, D., Iannaccone, S., Leshner, R., Mendell, J. R., Mendoza, M., Russman, B., Smith, S., King, W., & Kissel, J. T. (2009). An analysis of disease severity based on SMN2 copy number in adults with spinal muscular atrophy. *Muscle & Nerve*, 40(4), 652–656. <https://doi.org/10.1002/mus.21350>
- Farrar, M. A., Vucic, S., Johnston, H. M., Du Sart, D., & Kiernan, M. C. (2013). Pathophysiological Insights Derived by Natural History and Motor Function of Spinal Muscular Atrophy. *The Journal of Pediatrics*, 162(1), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.067>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>

- Javadov, S., Chapa-Dubocq, X., & Makarov, V. (2018). Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion*, 38, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.004>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessel, T. M. (1996). *Essentials of Neural Science and Behavior*.
- Kiyoto, S., Ichino, T., Awano, T., & Yazaki, K. (2022). Improved chemical fixation of lipid-secreting plant cells for transmission electron microscopy. *Microscopy*, 71(4), 206–213. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfac018>
- Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics*, 33(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.004>
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., & Melki, J. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
- Lorson, C. L., Strasswimmer, J., Yao, J.-M., Baleja, J. D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A. H. M., & Androphy, E. J. (1998). SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nature Genetics*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ng0598-63>
- Miller, N., Shi, H., Zelikovich, A. S., & Ma, Y.-C. (2016). Motor neuron mitochondrial dysfunction in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 25(16), 3395–3406. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw262>
- Murray, L. M., Lee, S., Bäumer, D., Parson, S. H., Talbot, K., & Gillingwater, T. H. (2010). Pre-symptomatic development of lower motor neuron connectivity in a

- mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 19(3), 420–433. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp506>
- Novelli, G., Calzà, L., Amicucci, P., Giardino, L., Pozza, M., Silani, V., Pizzuti, A., Gennarelli, M., Piombo, G., Capon, F., & Dallapiccola, B. (1997). Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues. *Biochemical and Molecular Medicine*, 61(1), 102–106. <https://doi.org/10.1006/bmme.1997.2590>
- Ohuchi, K., Funato, M., Ando, S., Inagaki, S., Sato, A., Kawase, C., Seki, J., Nakamura, S., Shimazawa, M., Kaneko, H., & Hara, H. (2019). Impairment of oligodendrocyte lineages in spinal muscular atrophy model systems. *NeuroReport*, 30(5), 350. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001206>
- Pandithage, R. (2013). *Brief Introduction to Contrasting for EM Sample Preparation*. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/brief-introduction-to-contrasting-for-em-sample-preparation/>
- Rao, V. K., Kapp, D., & Schroth, M. (2018). Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 24(12-a Suppl), S3–S16. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2018.24.12-a.s3>
- Ravi, R. T., Leung, M. R., & Zeev-Ben-Mordehai, T. (2020). Looking back and looking forward: Contributions of electron microscopy to the structural cell biology of gametes and fertilization. *Open Biology*, 10(9), 200186. <https://doi.org/10.1098/rsob.200186>
- Rose, H. H. (2016). Optics of high-performance electron microscopes. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(1), 014107. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/9/1/014107>

- Rothstein, R. P., & Levison, S. W. (2005). Gray Matter Oligodendrocyte Progenitors and Neurons Die Caspase-3 Mediated Deaths Subsequent to Mild Perinatal Hypoxic/Ischemic Insults. *Developmental Neuroscience*, 27(2–4), 149–159. <https://doi.org/10.1159/000085987>
- Rudnik-Schöneborn, S., Heller, R., Berg, C., Betzler, C., Grimm, T., Eggermann, T., Eggermann, K., Wirth, R., Wirth, B., & Zerres, K. (2008). Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *Journal of Medical Genetics*, 45(10), 635–638. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.057950>
- Salzer, J. L., & Zalc, B. (2016). Myelination. *Current Biology*, 26(20), R971–R975. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.074>
- Schorling, D. C., Pechmann, A., & Kirschner, J. (2020). Advances in Treatment of Spinal Muscular Atrophy—New Phenotypes, New Challenges, New Implications for Care. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.3233/JND-190424>
- Schroth, M. K. (2009). Special Considerations in the Respiratory Management of Spinal Muscular Atrophy. *Pediatrics*, 123(Supplement_4), S245–S249. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2952K>
- Simons, M., & Nave, K.-A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), a020479. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>
- Tein, I., Sloane, A. E., Donner, E. J., Lehotay, D. C., Millington, D. S., & Kelley, R. I. (1995). Fatty acid oxidation abnormalities in childhood-onset spinal muscular atrophy: Primary or secondary defect(s)? *Pediatric Neurology*, 12(1), 21–30. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(94\)00100-g](https://doi.org/10.1016/0887-8994(94)00100-g)

- Tizzano, E. F., & Finkel, R. S. (2017). Spinal muscular atrophy: A changing phenotype beyond the clinical trials. *Neuromuscular Disorders*, 27(10), 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.05.011>
- Wang, C. H., Finkel, R. S., Bertini, E. S., Schroth, M., Simonds, A., Wong, B., Aloysius, A., Morrison, L., Main, M., Crawford, T. O., & Trela, A. (2007). Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Child Neurology*, 22(8), 1027–1049. <https://doi.org/10.1177/0883073807305788>
- Watson, M. L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(4), 475–478. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.4.475>
- Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schöneborn, S., Wienker, T., & Zerres, K. (1999). Quantitative analysis of survival motor neuron copies: Identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *American Journal of Human Genetics*, 64(5), 1340–1356.
- Wolff, G., & Bárcena, M. (2021). Multiscale Electron Microscopy for the Study of Viral Replication Organelles. *Viruses*, 13(2), 197. <https://doi.org/10.3390/v13020197>
- Zerres, K., & Rudnik-Schöneborn, S. (1995). Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Archives of Neurology*, 52(5), 518–523. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540290108025>