

Szlak mTOR i zwierzęta transgeniczne z delecją genu *TSC* w procesie regeneracji układu nerwowego i wybranych modelach uszkodzeń nerwu kulszowego

STRESZCZENIE

Urazowe uszkodzenia układu nerwowego od lat są powszechnym zjawiskiem, które obniżają jakość życia pacjentów. Szlak mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) pełni kluczową rolę w fizjologii układu nerwowego, między innymi poprzez kontrolę przeżywania i różnicowania komórek nerwowych. Nadmierna aktywacja szlaku mTOR prowadzi do wzrostu aktywności białek cyklu komórkowego i apoptozy komórek nerwowych. Ponadto, aktualne odkrycia sugerują udział szlaku mTOR w neuroplastyczności. Wykorzystanie zwierząt transgenicznych z delecją genu *TSC* jak i różnych modeli uszkodzeń nerwu kulszowego, pozwala na aktywację szlaku mTOR. Obecnie wyniki badań potwierdzają, iż inaktywacja mutacji punktowych w genach *TSC-1* lub *TSC-2* aktywuje kanoniczną ścieżkę sygnałową kompleksu mTORC-1, z kolei reaktywacja szlaku mTORC-1 poprzez absencję genu *TSC-1* w dojrzałych neuronach indukuje regenerację aksonów. Zaburzenia funkcji szlaku mTORC-1 w komórkach Schwanna hamują mielinizację włókien nerwowych. Celem niniejszej pracy jest usystematyzowanie wiedzy i przedstawienie roli szlaku mTOR, jak również wykazanie roli delecji genu *TSC* w procesie regeneracji układu nerwowego. Obecne badania nad aktywnością szlaku mTOR mogą zapewnić nowe strategie intensyfikowania regeneracji nerwów obwodowych.

WPROWADZENIE

Urazowe uszkodzenia obwodowego układu nerwowego od lat są powszechnym zjawiskiem doprowadzającym do utraty jego funkcji bądź rozwoju bólu neuropatycznego i stanowią od 2 do 3% wszystkich urazów nerwów [1]. Uszkodzenia nerwów obwodowych mogą wystąpić w wyniku następujących: przyczyn: wypadków komunikacyjnych, obrażeń ostrymi przedmiotami czy złamań kości długich, infekcji bądź chorób autoimmunologicznych. Skutki urazu obwodowego układu nerwowego mogą być różne w zależności od lokalizacji i nasilenia uszkodzenia. Najczęściej obejmują: utratę czucia, osłabienie mięśni, problemy z ruchem, mrowienie, drętwienie, ból lub trudności z koordynacją. W leczeniu urazów obwodowego układu nerwowego wprowadza się rehabilitację, fizjoterapię bądź leczenie farmakologiczne. Pomimo zaawansowanych technik chirurgicznych przywracanie funkcji ruchowych i czuciowych często jest nieosiągalne. Konieczne jest zatem opracowanie i wprowadzenie skutecznego leczenia sprzyjającego regeneracji. Obwodowy układ nerwowy cechuje się zdolnością regeneracji, dlatego w wyniku uszkodzenia nerwów obwodowych o umiarkowanym nasileniu, istnieje możliwość przywrócenia funkcji czuciowo – ruchowych w obszarze, który unerwiają. Rola szlaku mTOR w regeneracji nerwu kulszowego znajduje się w fazie intensywnych badań naukowych, jednak nadal w pełni nie jest zrozumiana. Brak zdolności regeneracyjnej neuronów został powiązany z obniżeniem aktywności mTOR. Pojawiające się w ostatnich latach prace doświadczalne potwierdzają, iż aktywacja szlaku mTOR, poprzez delecję genów *TSC* (ang. *tuberous sclerosis complex*) odgrywa istotną rolę w procesie regeneracji nerwów obwodowych, stymulując wzrost aksonów [2,3]. Gen *TSC1* jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 9 (9q34) i odpowiada za kodowanie hamartyny, białka o ciężarze cząsteczkowym 130 kDa. Gen *TSC2* jest umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 16 (16p13.3) i warunkuje wytwarzanie tuberyny, białka o ciężarze cząsteczkowym 180 kDa [4,5].

W celu wyjaśnienia roli szlaku mTOR, w badaniach eksperymentalnych wykorzystuje się zwierzęta transgeniczne. Mutanty stosowane są jako modele do badań procesów regeneracji nerwów i poszukiwania nowych terapii. Służą jako model do badania czynników wzrostu nerwów, białek czy genów związanych z procesami odnowy uszkodzonych neurytów. Dodatkowo, wykorzystanie modeli transgenicznych pozwala na ocenę wpływu zmian genetycznych w procesach regeneracji, badania interakcji między różnymi genami i czynnikami ekspresji. Jest to bardzo istotne, gdyż poznanie fizjologicznej roli czynników neurotroficznych może stanowić obiecującą perspektywę we wzbudzeniu regeneracji

mgr Natalia Białoń^{1,2,✉},
dr Krzysztof Suszyński¹,
mgr Mikołaj Górka^{2,3},
dr Michał Trzęsicki¹,
dr hab. Dariusz Górka¹,
Kacper Zajac¹,
mgr Agata Kupczak¹

¹Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Szkoła Doktorska Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

³Centrum Medycyny Doświadczalnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

https://doi.org/10.18388/pb.2021_489

✉autor korespondujący: d201080@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: ssaczy cel rapamycyny, mTOR, *TSC*, regeneracja nerwu kulszowego, neurotrofiny, neuroplastyczność

Wykaz skrótów: BDNF – (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; cAMP – (ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*) – cykliczna pochodna adenylo-5'-monofosforanu; CNTF – (ang. *ciliary neurotrophic factor*) – rzęskowy czynnik neurotroficzny; DAMPs – (ang. *damage-associated molecular patterns*) – alarminy, struktury molekularne związane z uszkodzeniem; FGF – (ang. *fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; GDNF – (ang. *glial cell derived neurotrophic factor*) – czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego; IL-1 – (ang. *Interleukin 1*) – interleukina 1; IL-10 – (ang. *Interleukin 10*) – interleukina 10; IL-6 – (ang. *Interleukin 6*) – interleukina 6; LPC – (ang. *lysophosphatidylcholine*) – lizofosfatydylocholina; mTOR – (ang. *mammalian target of rapamycin*) – ssaczy cel rapamycyny; NT-3 – (ang. *neurotrophin 3*) – neurotrofina 3; OUN – (ang. *central nervous system*) – ośrodkowy układ nerwowy; TNF- α – (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów; *TSC* – (ang. *tuberous sclerosis complex*) – kompleks stwardnienia guzowatego

Tabela 1. Klasyfikacja uszkodzeń nerwów obwodowych wprowadzona przez Seddona w 1942 roku [6,7].

Rodzaje uszkodzeń nerwów obwodowych	Charakterystyka
<i>Neuropraxia</i>	Jest określana jako najłagodniejszy stopień uszkodzenia nerwu obwodowego. Charakteryzuje się tymczasowym zablokowaniem przewodzenia impulsów wzdłuż nerwu. Nie dochodzi do przerwania ciągłości aksonów i tkanki łącznej, lecz ogniskowego uszkodzenia osłonki mielinowej. Wśród przyczyn neuropraksji wyróżnia się niewielki uraz nerwu, ucisk czy przeciążenie. Ustępuje szybko, najczęściej do kilku dni. Nie wymaga leczenia chirurgicznego.
<i>Axonotmesis</i>	Charakteryzuje się przerwaniem ciągłości aksonów bez naruszenia tkanki łącznej. W sytuacji, gdy zaburzenia unerwienia mięśnia nie przekraczają 12 miesięcy, możliwa jest samoistna regeneracja i przywrócenie funkcji.
<i>Neurotmesis</i>	Całkowite przerwanie ciągłości nerwu wraz z uszkodzeniem osłonki mielinowej. Samoistna regeneracja nie jest możliwa, niezbędna jest interwencja chirurgiczna.

nerwów obwodowych. Może mieć to znaczenie dla rodzaju zastosowania terapii u pacjentów z uszkodzonym nerwem obwodowym.

KLASYFIKACJA USZKODZEŃ NERWÓW OBWODOWYCH

W literaturze przedstawiono podział nerwów obwodowych biorąc pod uwagę obszar obejmujący elementy strukturalne tkanki nerwowej. Tabela 1 przedstawia pierwszą klasyfikację, wprowadzoną przez Seddona w 1942 roku, która następnie została rozszerzona przez Sunderlanda w 1951 roku do 5 – stopniowej skali. Wprowadzono następujące zmiany: stopień I odpowiada uszkodzeniom typu *neuropraxia*, z kolei stopień V – *neurotmesis*. Uszkodzenia typu *axonotmesis* zostały rozwinięte o 3 stopnie: stopień II związany jest z uszkodzeniami aksonów, bez naruszenia tkanki łącznej, natomiast w stopniu III uszkodzeniu ulega także endoneurium. Stopień IV obejmuje uszkodzenia epi-neurium [8,9].

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH MODELI USZKODZEŃ NERWU KULSZOWEGO

Jak wynika z przeglądu literatury na przełomie ostatnich lat zastosowano wiele modeli uszkodzeń nerwu kulszowego, wykorzystując mysz bądź szczurzy model zwierzęcy.

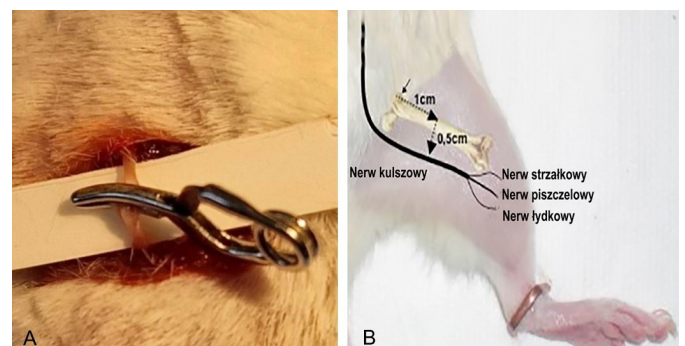
ZMIAŹDŻENIE NERWU KULSZOWEGO

Najczęściej pojawiającym się modelem uszkodzenia nerwu kulszowego jest model zmiażdżenia. Z obserwacji uprzednio wykonywanych podobnych zabiegów chirurgicznych wynika, że tego typu model uszkodzenia nerwu kulszowego nie powoduje znacznej dotkliwości zwierzęcia, przy tym nie ograniczając jego lokomocji. W znieczuleniu ogólnym dootrzewnowym na zewnętrznej powierzchni tylnego uda gryzonia wykonuje się nacięcie skóry o długości około 1 cm. Oryginalne artykuły naukowe w części metodologicznej opisują do tego celu zastosowanie klipsa mikronaczyniowego [10-12] bądź zmiażdżenie nerwu przy pomocy kleszczy (szczypcy) chirurgicznych o czasie trwania nacisku około 20-30 sekund [11,13-17], oraz kleszczyków hemostaticznych o łącznym czasie trwania zmiażdżenia 30 sekund (procedura polega na trzykrotnym zmiażdżeniu nerwu kulszowego przez 10 sekund) [18]. Miejsce zmiażdżenia wykonuje się najczęściej przed miejscem trifurkacji – czyli rozgałęzienia (rozwidlenia) nerwu kulszowego na nerw

piszczelowy, łydkowy i strzałkowy. Następnie rana zostaje zaopatrzona szwami. Rycina 1 przedstawia moment ucisku nerwu kulszowego przy pomocy klipsa naczyniowego oraz anatomiczne przedstawienie miejsca trifurkacji.

MROŻENIE NERWU KULSZOWEGO

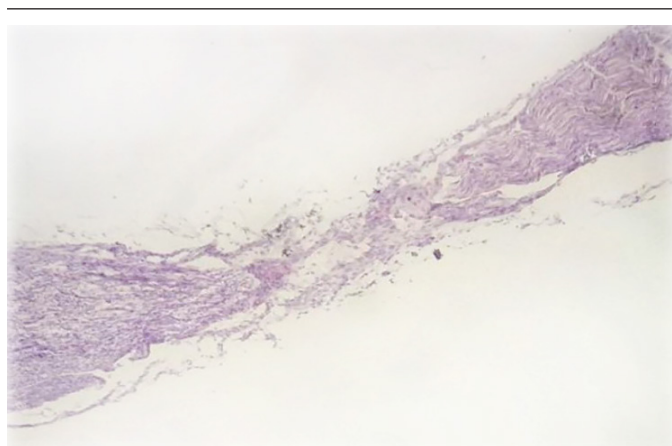
Uszkodzenie nerwu kulszowego poprzez mrożenie jest rzadziej praktykowanym i opisywanym w literaturze modelem. Procedura polega na „indukcji zimnem” i miejscowym zamrożeniu w celu wywołania urazu nerwu. Myers i wsp. [20] opracowali metodę, w której zastosowali kriosondę o temperaturze -60°C i czasie trwania od 2 do 60 sekund. Co istotne, wykazali, że istniał bezpośredni związek między czasem trwania miejscowego mrożenia nerwu a intensywnością degeneracji Wallera oraz liczbą uszkodzonych włókien nerwowych. Częściowe uszkodzenie nerwu kulszowego ze zwyrodnieniem aksonów spowodowało w pierwszych dniach po urazie rozwój hiperalgezji (nadmiernej wrażliwości na ból), która osiągała maksymalną intensywność około 1 tygodnia po urazie, ustępując w ciągu następnych kilku tygodni. Warto zaznaczyć, że siła odpowiedzi hiperalgetycznej jak i jej utrzymanie się bezpośrednio koreluje z czasem trwania mrożenia nerwu [51]. W badaniach eksperymentalnych [21] zastosowano metodę mrożenia nerwu kulszowego w oparciu o sekwencję chłodzenia, która wynosiła 1°C przez 20 min, 2°C przez 10 min, 3°C przez 10 min, 4°C przez 10 min oraz 5°C przez 10 minut. Cykl ten dwukrotnie powtórzono, aż do osiągnięcia 3 godzin chłodzenia. Wykazano, że model uszkodzenia polegający na trzygodzinnym mrożeniu nerwu kulszowego doprowadził do redukcji i nieodwracalnych zmian,



Rycina 1. Ucisk nerwu kulszowego oraz anatomiczne przedstawienie miejsca trifurkacji. A) Fotografia przedstawiająca moment ucisku nerwu kulszowego myszy za pomocą klipsa naczyniowego (źródło: materiały własne) B) Rozwidlenie nerwu kulszowego na nerw piszczelowy, łydkowy i strzałkowy – trifurkacja (na podstawie [19], z własnymi modyfikacjami).

związanych z przepływem krwi w nerwach (ang. *nerve blood flow, NBF*). Zaobserwowano stopniowy spadek średniej wartości NBF w mrożonych nerwach kulszowych, a także zwężenie i nieregularność tętniczek i metaarterioli. Przepływ w naczyniach, oceniony na podstawie ruchu erytrocytów był powolny i statyczny. Indukcja niską temperaturą aż do osiągnięcia 3 godzin doprowadziła do uszkodzenia bariery krew – nerw oraz obrzęku śródnierwia [21].

Kolejne badania eksperymentalne na temat wpływu niskiej temperatury na barierę krew – nerw przeprowadził Hao i wsp.[22]. Autorzy wykorzystali w doświadczeniu model chłodzenia stworzony i opisany wcześniej przez Jia i Pollocka (1997). Po upływie 1, 3 i 5 dni od urazu spowodowanego zimnem obserwowano i porównywano uszkodzone i nieuszkodzone nerwy kulszowe szczurzego modelu rasy Wistar. Do obserwacji morfologicznej i oceny przepuszczalności bariery krew – mózg wykorzystano błękit Evansa, zaliczany do barwników diazowych, szeroko stosowany w medycynie do oceny przepuszczalności naczyń, lokalizacji węzłów chłonnych czy zmian nowotworowych. Już w pierwszym dniu po uszkodzeniu zimnem obserwacja mikroskopowa potwierdziła rozległą degenerację włókien mielinowych, zwyrodnienie aksonów oraz obrzęk komórek śródbłonka, który zwęził światło naczyń włosowatych śródnierwia. Po upływie 3 i 5 dni degeneracja włókien mielinowych stała się bardziej dotkliwa, jednak obrzęk nerwów był bardziej widoczny po 1 dniu urazu. Zjawisko to prawdopodobnie może być spowodowane podwyższonym ciśnieniem płynu śródnierwowego. Badania doświadczalne sugerują, że leczenie farmakologiczne u pacjentów cierpiących na urazy obwodowego układu nerwowego spowodowane zimnem, powinno zostać wprowadzone we wczesnym okresie urazu. Związane jest to z dotarciem leku do miejsca urazu poprzez mikrokrążenie, które może zostać zaburzone w wyniku wzrostu ciśnienia płynu tkankowego [22]. Podobne uszkodzenia wywołwane niską temperaturą przeprowadzane zostały przez Ubogu i wsp. [23], Yosef i Ubogu [24] oraz Kusunoki [10]. Na rycinie 2 przedstawiono fotografię mikroskopową nerwu kulszowego po uszkodzeniu neurytu niską temperaturą.



Rycina 2. Fotografia mikroskopowa nerwu kulszowego myszy po wywołaniu uszkodzenia metodą mrożenia. Zastosowano aplikator miejscowo na nerw. Czas mrożenia nerwu 30 sekund. Uszkodzony nerw wybarwiono eozyną i hematoksyliną (źródło: materiały własne).

INNE SPOSOBY USZKODZENIA NERWU KULSZOWEGO

Literatura opisuje także inne sposoby uszkodzenia, które opierają się na metodzie przecięcia bądź rozciągnięcia nerwu kulszowego. Umansky i wsp. (2022) [11] w badaniach eksperymentalnych porównywali zmiany funkcjonalne oraz histologiczne, które zachodzą po wywołaniu urazu sposobem rozciągania i zmiżdżenia (jednocześnie) – model określony jako „stretch – crush” z uszkodzeniem poprzez zmiżdżenie [11]. Uraz nerwu rozciągająco – zmiżdżeniowy jest jednym z najczęściej spotykanych klinicznie [12,13]. W doświadczeniach stosuje się do tego celu sprężynę trakcyjną, umieszczoną 10 mm od części proksymalnej do punktu trójdzielnego nerwu kulszowego. Wyniki badań powyższego doświadczenia, sugerują, że model „stretch – crush” jest bardziej porównywalny do urazów obwodowego układu nerwowego u pacjentów niż model zmiżdżenia, a zatem może być dokładniejszym modelem, służącym do oceny regeneracji nerwu [11].

Średni wiek zwierząt biorących udział w powyższych eksperymentach wynosił 7 – 12 tygodni. W badaniach najczęściej przeważały samce szczura ze względu na większy nerw kulszowy w porównaniu do mysiego modelu, co ułatwiało jego preparowanie. Samice mysie bądź szczurze rzadziej wykorzystywane są w eksperymentach. Wybór płci gryzoni do badań eksperymentalnych zależy od wielu czynników. W przypadku doświadczeń związanych z regeneracją nerwu kulszowego, ogranicza się wykorzystywanie samic, z powodu cyklu hormonalnego, gdyż hormony, takie jak estrogeny czy progesteron, mogą wykazywać zmienność w odpowiedzi biologicznej, co utrudnia otrzymanie rzetelnych wyników badań. Dodatkowo, przyjmuje się, że samice myszy mogą być bardziej podatne na stres związany z okresem ciąży, porodem i opieką nad potomstwem.

MOLEKULARNE PODŁOŻE REGENERACJI NERWÓW OBWODOWYCH

Obwodowy układ nerwowy cechuje się zdolnością do samoistnej regeneracji jak i szybkiej reaktywacji wewnętrznych szlaków wzrostu neuronu już w krótkim czasie po uszkodzeniu. Molekularne mechanizmy regeneracji nerwów obwodowych są procesami bardzo złożonymi, w których istotną rolę odgrywają komórki Schwanna, napływające makrofagi oraz limfocyty T pomocnicze. Komórki Schwanna są źródłem wielu różnorodnych substancji oddziałujących na rosnące włókna, między innymi: cząsteczki adhezyjne, składniki macierzy pozakomórkowej oraz cytokiny i czynniki wzrostu [25,26]. Według Matthews najważniejszymi składnikami substancji pozakomórkowej, mogących ułatwiać wzrastanie aksonów, są lamina i fibronektyna [27,28]. Dodatkowo, komórki Schwanna w warunkach fizjologicznych wykazują funkcję ochronną aksonów, reagują na zmiany w stężeniu jonów wapnia, inicjują procesy naprawcze poprzez zwiększenie przepuszczalności bariery krew – nerw. Mają zdolność do prezentacji antygenów, poprzez układ zgodności tkankowej klasy I [29]. Zmiżdżenie, niedokrwienie bądź przerwanie ciągłości nerwu obwodowego, wyzwala szereg mechanizmów prowadzących do naprawy i odzyskania połączenia nerwu. Regeneracja neurytu zaczyna się już po upływie doby od

Tabela 2. Rola czynników regulujących proces regeneracji nerwu obwodowego.

Wybrane komórki i czynniki regulujące proces regeneracji nerwu obwodowego	Rola
komórki Schwanna	biorą udział w syntezie substancji oddziałujących na rosnące włókna ochraniają aksony warunkują wzrost przepuszczalności bariery krew – nerw prezentują antygeny
makrofagi, neutrofile	oczyszczają uszkodzony obszar neurytu z komórek i tkanek inicjują wzrost aksonów poprzez wydzielanie czynników neurotroficznych syntezują czynniki przeciwzapalne
limfocyty T pomocnicze	syntezują prozapalne interleukiny TNF- α syntezują przeciwzapalne IL-4 oraz IL-10
lamina, fibronektyna	usprawniają wzrost aksonów
jony wapnia Ca ²⁺	aktywują proces apoptozy biorą udział w syntezie DAMPs oraz lizofosfatydylocholin
DAMPs, lizofosfatydylocholin	działają chemotaktycznie na komórki układu immunologicznego
IL-10	obniżają ekspresję cytokin prozapalnych uczestniczą w przekształceniu makrofagów prozapalnych w makrofagi przeciwzapalne

wystąpienia urazu a przywrócenie utraconego połączenia nerwowego obejmuje trzy główne etapy:

I. Zwyródnienie Wallera w dystalnym kikucie nerwu, opisane po raz pierwszy przez Augustusa Wallera w 1850 roku, u żab po przecięciu nerwu podjęzykowego i językowo – gardłowego.

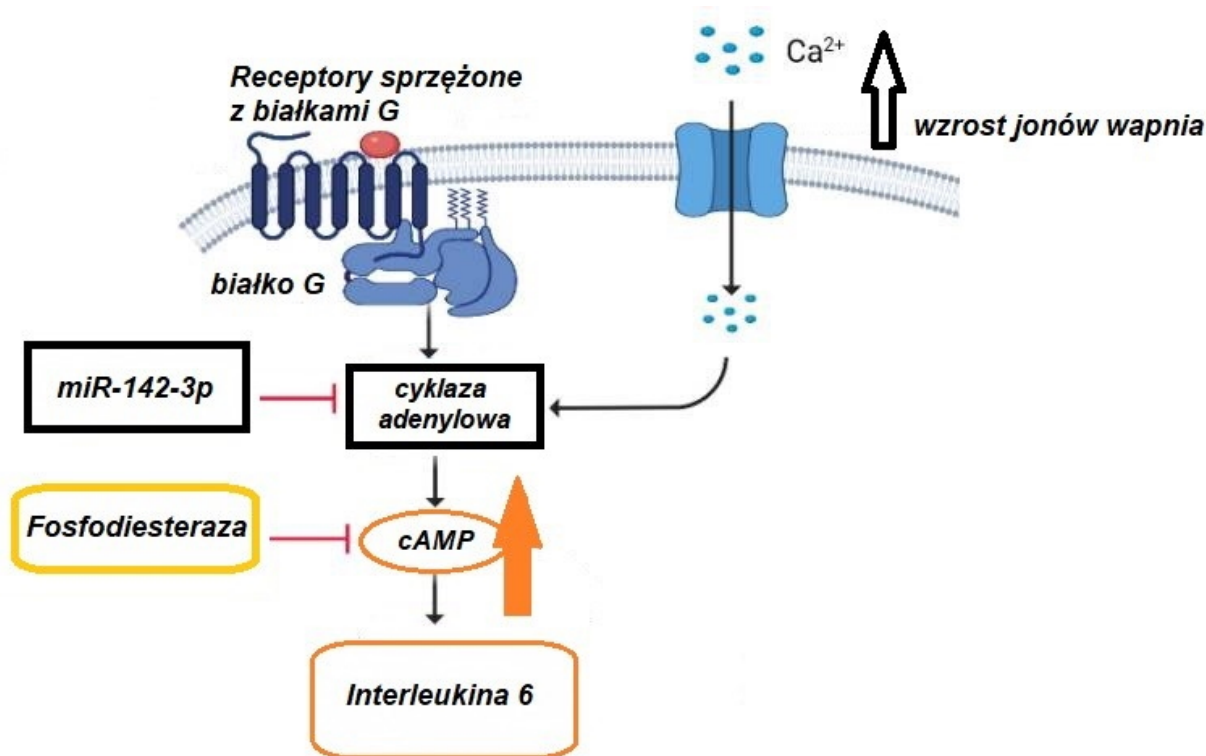
II. Regenerację aksonów z części proksymalnej w kierunku dystalnym.

III. Reinerwację tkanki, z którą powiązany był zniszczony nerw.

To, czy proces regeneracji przebiegnie pozytywnie, zależy od odległości między końcem proksymalnym a dystalnym uszkodzonego nerwu. Zaburzenie na którymkolwiek z powyższych etapów regeneracji, może prowadzić do rozwoju nerwiaków pourazowych, które stanowią główną przyczynę uciążliwego bólu neuropatycznego u pacjentów [29,30].

W konsekwencji przerwania ciągłości włókien nerwowych dochodzi do całkowitej degeneracji postępującej odśrodkowo w obrębie obwodowego odcinka aksonu, określane jako degenerację Wallera, która rozpoczyna się już w pierwszych godzinach od ustania działania czynników uszkodzających nerw obwodowy [29]. Zachodzi w dystalnym kikucie uszkodzonego nerwu, gdzie pojawiają się zmiany komórkowe, molekularne, aktywacja komórek Schwanna oraz regulacja syntezy neurotrofin i cytokin [25]. Obejmuje degenerację zniszczonych aksonów i ich osłonek mielinowych, wyzwala napływ komórek układu immunologicznego oraz oczyszczenie uszkodzonego obszaru neurytu. W wyniku uszkodzenia błony komórkowej aksonów z macierzy zewnątrzkomórkowej do wnętrza aksonu napływają jony wapnia (Ca²⁺) aktywując proces apoptozy, definiowany jako naturalna, zaprogramowana śmierć komórki. Ca²⁺ wyzwala syntezę czynników związanych z uszkodzeniem – DAMPs (ang. *damage-associated molecular patterns*) oraz lizofosfatydylocholin (LPC), które wspólnie z uwalnianymi przez komórki Schwanna interleukinami

prozapalnymi (TNF- α , IL-1, IL-6) wykazują działanie chemotaktyczne na komórki układu immunologicznego: limfocyty T (Th1, Th2), neutrofile (N), makrofagi (M), które oczyszczają uszkodzony obszar neurytu z komórek i tkanek a także inicjują wzrost aksonów poprzez wydzielanie czynników neurotroficznych (CNTF, NT-3, FGF), przygotowując nerw do mielinizacji i regeneracji rosnących aksonów [31,32]. Dodatkowo, makrofagi uwalniają czynniki przeciwzapalne, między innymi IL-10, która obniża ekspresję cytokin prozapalnych i jest konieczna do przekształcenia makrofagów prozapalnych (M1) w makrofagi przeciwzapalne (M2), które uczestniczą w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki [33]. Neutrofile odgrywają rolę w oczyszczaniu fragmentów zdegenerowanych komórek. W nerwach obwodowych, w warunkach homeostazy, znajduje się ich niewielka ilość, jednak w sytuacji uszkodzenia w ciągu 24 godzin, liczba ich gwałtownie wzrasta poprzez migrację z naczyń krwionośnych [29]. Ostatnią grupą komórek, uczestniczącą w modulowaniu odpowiedzi zapalnej – humoralnej jak i komórkowej, poprzez syntezę cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych są limfocyty T. Prozapalne interleukiny TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) wydzielane są przez limfocyty T pomocnicze typu 1 (Th1), z kolei limfocyty pomocnicze typu 2 uwalniają przeciwzapalną IL-4 oraz IL-10 [29,34]. Istotna jest równowaga w aktywności cytokin i czynników troficznych, która warunkuje prawidłową regenerację aksonów [35]. Dieu i wsp. wykazali, że w czasie uszkodzenia nerwów obwodowych w dystalnym kikucie przerwane nerwu zwiększa się ekspresja mRNA neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) oraz neurotroficznego czynnika pochodzenia glejowego (ang. *glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF), natomiast obniżeniu ulega ekspresja neurotrofiny 3 (NT-3) oraz rzęskowego czynnika neurotroficznego (ang. *ciliary neurotrophic factor*, CNTF) [29,36]. Warto zwrócić uwagę także na kolejność etapów całego procesu regeneracji, gdyż wszelkie nieprawidłowości w pierwszym etapie zakłóca kolejne, a to ograniczy odzyskanie funkcji uszkodzonego nerwu [29]. Tabela 2 ilustruje



Rycina 3. Ścieżki sygnałowe w regeneracji nerwu obwodowego. W wyniku urazu nerwu obwodowego następuje wzrost Ca²⁺. Jony wapnia poprzez nasiloną ekspresję cyklazy adenylowej zwiększają poziom cAMP, który stymuluje syntezę IL-6, aktywując kolejne szlaki. Obniżenie ekspresji miR-142-3p i fosfodiesterazy koreluje ze wzrostem poziomu cAMP.

udział wyżej wymienionych czynników w procesie regeneracji nerwu obwodowego.

MOLEKULARNE SZLAKI SYGNAŁOWE W REGENERACJI NERWU OBWODOWEGO

Szlaki sygnałowe, określane także ścieżkami sygnałowymi, definiowane są jako szereg procesów biochemicznych, pochodzących z wnętrza komórki bądź środowiska zewnętrznego, prowadzące do zmian procesów życiowych w komórce. Wyróżnia się kilka szlaków sygnałowych (Ryc. 3), które w wyniku urazu bądź aksonotomii, powiązane są z procesem regeneracji aksonów.

ŚCIEŻKA SYGNAŁOWA CAMP

Uszkodzenie nerwów obwodowych wywołuje uwolnienie jonów wapnia, które zwiększają poziom cAMP (ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), regulując szlaki w neuronach, co przyczynia się do wzrostu neurytów. cAMP jest kluczowym dla wzrostu neuronu wewnątrzkomórkowym wtórnym przekaźnikiem w wielu szlakach transdukcji sygnału. Reguluje wzrost i różnicowanie komórek, transkrypcję genów i ekspresję białek. Ma to istotne znaczenie dla prawidłowej regeneracji aksonów. Wiele badań doświadczalnych potwierdza, że sygnalizacja cAMP stymuluje kolejne szlaki, które pobudzają wzrost neurytów po uszkodzeniu [37,38].

SZLAK WAPNIA

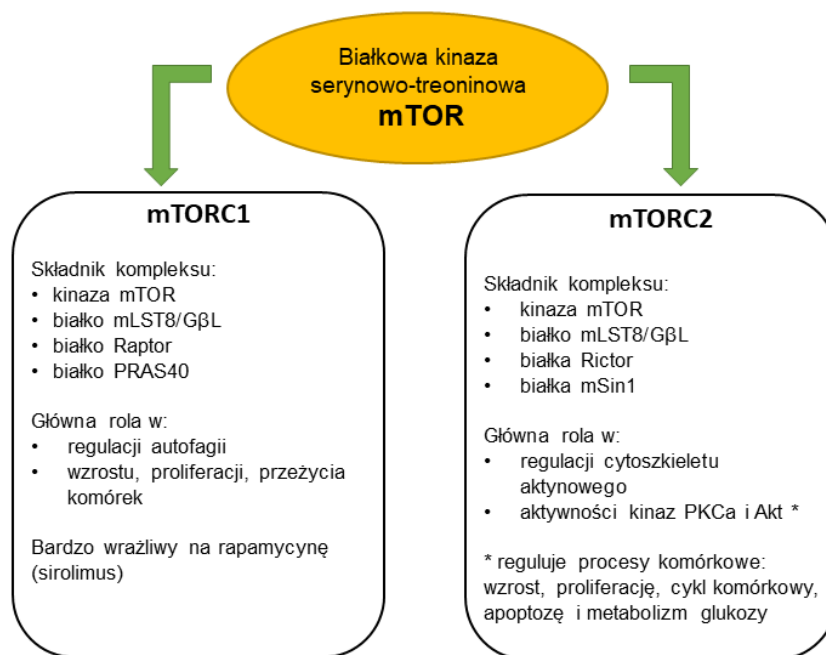
Wapń jest najważniejszym czynnikiem regulującym ekspresję cAMP po urazie nerwu obwodowego. Badania doświadczalne wykorzystując model wolnożyjącego, nieparazytycznego nicienia *Caenorhabditis elegans* wykazały, iż po aksonotomii laserowej Ca²⁺ zwiększa aktywność cyklazy adenylowej (AC) [39], wywołując tym samym syntezę cAMP. Przyspiesza to rozwój stożków wzrostu rozwijających się neurytów i wzmacnia połączenia między uszkodzonymi fragmentami aksonów [38].

SZLAK IL-6

Rozwój stanu zapalnego w miejscu uszkodzenia nerwu obwodowego jest konieczny w celu usunięcia zdegradowanych, nieprawidłowych tkanek i komórek. Zapalenie regeneruje aksony i warunkuje neuroprotekcję. W odpowiedzi na uraz stwierdzono większą ekspresję mediatorów cytokin, między innymi: interleukiny 6 (IL 6) oraz rzęskowego czynnika neurotroficznego (CNTF). W układzie nerwowym dorosłej osoby, w warunkach fizjologicznych, IL-6 występuje tylko w ograniczonych ilościach. W momencie urazu jej ekspresja wzrasta, co wykazuje pobudzenie wzrostu neurytu. Intensyfikacja szlaku cAMP po urazie bezpośrednio pośredniczy w uwolnieniu IL-6, co aktywuje kolejne szlaki [40].

ŚCIEŻKA MIR-142-3P

miR-142-3p odgrywa kluczową rolę w regulacji syntezy cAMP z trifosforanu adenozyliny (ATP). Badania dowodzą,



Rycina 4. Kompleksy białkowe mTOR, budowa i ich główna rola [43-45].

że po upływie 9 godzin od momentu uszkodzenia nerwu kulszowego, spadek ekspresji miR-142-3p zwiększył poziom cAMP, co poprawiło regenerację neuronów czuciowych [41,42].

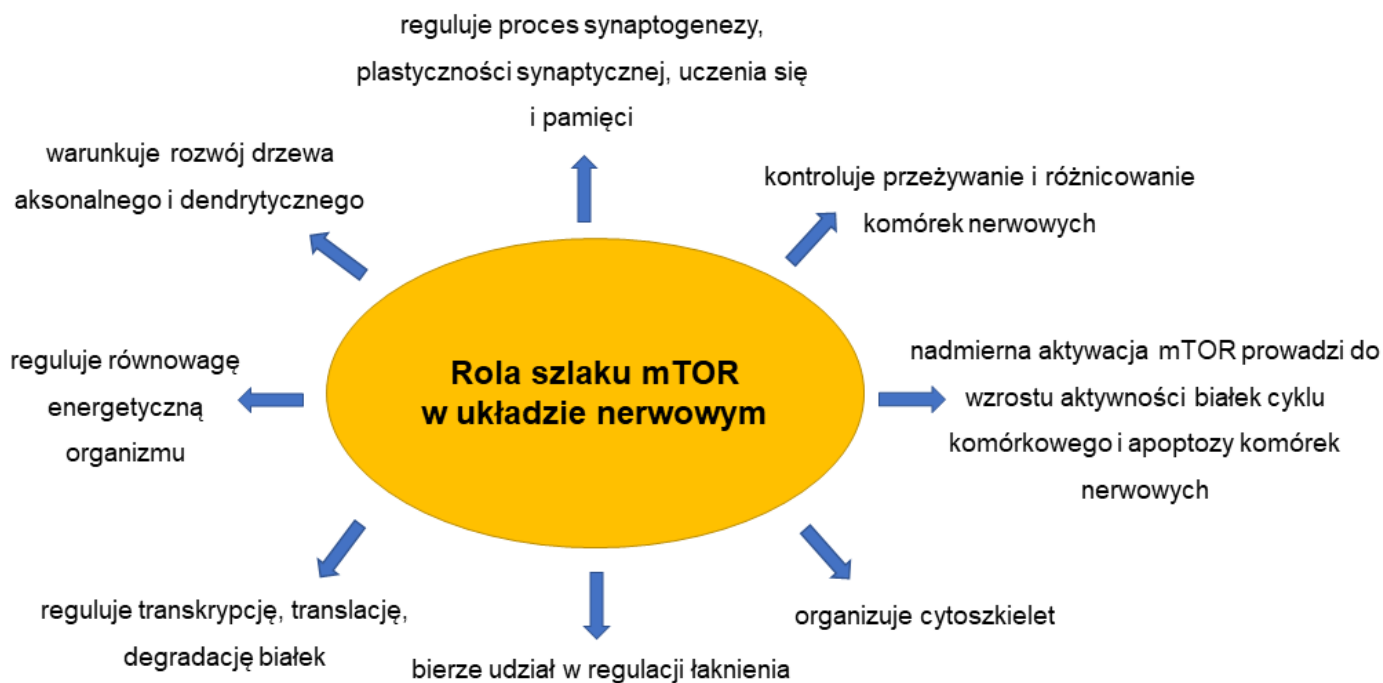
ROLA SZLAKU mTOR W FIZJOLOGII I ROZWOJU UKŁADU NERWOWEGO

Białkowa kinaza serynowo-treoninowa mTOR jest kodowana przez gen umiejscowiony na chromosomie 1p36.2 i pełni istotną funkcję w proliferacji, wzroście i różnicowaniu komórek [43]. Jest zaangażowana w kontrolę procesów wzrostu i podziału komórki. W komórkach ośrodkowego układu nerwowego (ang. *central nervous system*) mTOR reguluje proces transkrypcji, translacji, uczestniczy w transporcie pęcherzyków komórkowych, organizacji cytoszkieletu czy degradacji białek [44]. Regulacja aktywności kinazy mTOR odbywa się poprzez sygnały takie jak: dostępność składników odżywczych, czynniki wzrostu, hormony, stan energetyczny komórki i czynniki stresogenne, które obejmują: niedotlenienie, infekcje wirusowe, szok cieplny czy uszkodzenie DNA. Wyróżnia się dwa funkcjonalnie odrębne kompleksy białkowe mTOR: mTORC1 i mTORC2, których ogólną budowę i funkcję przedstawiono na rycinie 4 [45].

W komórkach nerwowych mTOR reguluje procesy rozwoju wypustek dendrytycznych i aksonalnych, plastyczność synaptyczną, synaptogenezę, uczenie się oraz formowanie pamięci [46]. Wykazuje także istotną rolę w mechanizmach regulujących łaknienie [44]. Bateman i McNeill wykorzystując model muszki owocowej potwierdzili, że mTOR odgrywa funkcję w regulacji czasu różnicowania omatydów (fotoreceptor, podstawowy element budowy oka złożonego u owadów, w obrębie którego znajdują się komórki siatkówki). Mutanty pozbawione genu *TSC1*, ce-

chowały się wystąpieniem nieprawidłowości w budowie oka. Zwiększenie aktywności szlaku mTOR prowadzi do przedwczesnego różnicowania omatydów, z kolei zahamowanie aktywności ścieżki sygnalizacyjnej opóźnia ten proces [44,47]. Pomimo, iż mTOR określany jest jako ssaczy cel rapamycyny, Jaworski i wsp. wykorzystując model żaby szponiastej *Xenopus* [48] wykazali, iż zastosowane inhibitory syntezy białek – cykloheksymid i anizomycyna oraz rapamycyna (lek immunosupresyjny, z grupy antybiotyków makrolidowych) – inhibitor mTOR w neuronach siatkówki przyczyniają się do zaburzeń w rozwoju aksonu. Inhibicja procesu translacji przez rapamycynę, ma miejsce również w izolowanych stożkach wzrostu aksonów, co tłumaczy, że mTOR zaangażowany jest w miejscową regulację translacji w procesie wzrostu aksonu [48]. Ponadto, potwierdzony został także udział szlaku mTOR w regulacji rozwoju drzewa dendrytycznego. Rapamycyna, hamując aktywność szlaku mTOR w neuronach hipokampu (struktura układu limbicznego, odpowiedzialna głównie za pamięć) prowadzi do zmniejszenia liczby dendrytów [49,50]. Z kolei domózgowe podanie rapamycyny do ciała migdałowatego hamuje aktywność ścieżki mTOR, przyczyniając się do zablokowania procesu formowania śladu pamięciowego [51]. Szlak mTOR odgrywa istotną rolę w neuroplastyczności i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Moduluje proliferację, plastyczność synaptyczną oraz pośredniczy w tworzeniu śladów pamięciowych [52] (Ryc. 5).

Nieprawidłowa aktywność mTOR stanowi także jedną z przyczyn licznych neuropatologii, nowotworów czy chorób neurodegeneracyjnych, między innymi: choroby Alzheimera, Huntingtona i Parkinsona [44].



Rycina 5. Rola szlaku mTOR w fizjologii układu nerwowego [44]

ZWIERZĘTA TRANSGENICZNE W NEUROBIOLOGII – ABSENCJA GENU *TSC*, OBIECUJĄCY MYSI MODEL, KTÓRY MOŻE POSŁUŻYĆ W BADANIACH NAD PROCESEM REGENERACJI NERWU OBWODOWEGO

Zwierzęta transgeniczne na przełomie ostatnich 20 lat stały się istotnym narzędziem badawczym w wielu naukach medycznych jak i neurobiologicznych. Modele zwierzęce, w szczególności gryzonie, są często wykorzystywane w badaniach naukowych w celu zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw regeneracji układu nerwowego. Mysie modele są szeroko stosowane jako narzędzie badawcze, gdyż cechuje je łagodne usposobienie, krótki cykl życiowy, niskie koszty oraz łatwość utrzymania hodowli. Mysi model z absencją genu *TSC*, charakteryzuje się modyfikacją genetyczną regulatorów syntezy kompleksu mTORC-1. Ze względu na wprowadzone modyfikacje genetyczne badanych zwierząt, niezbędna jest ich genotypizacja, celem potwierdzenia obecności wprowadzonych mutacji. Genotypy wszystkich badanych myszy potwierdza się za pomocą reakcji PCR. DNA do reakcji PCR izoluje się z końcówki ogona myszy. Mutanty *TSC 1* posiadają miejsca loxP flankujące eksony 17 i 18 genu *Tsc1*. Ten zmutowany szczep może być użytkowy w badaniach tkankowych – stwardnieniu guzowatym lub innych zespołach hamartoma (zaburzenie rozwojowe, występujące w wielu narządach przyjmującego formę guza, lecz niewykazującego charakteru nowotworowego). Dodatkowo w regulacji cytoszkieletu aktywnego, komórkowej i organizmowej homeostazy glukozy, odpowiedzi wzrostu komórek, regulacji wielkości komórek i regulacji apoptozy.

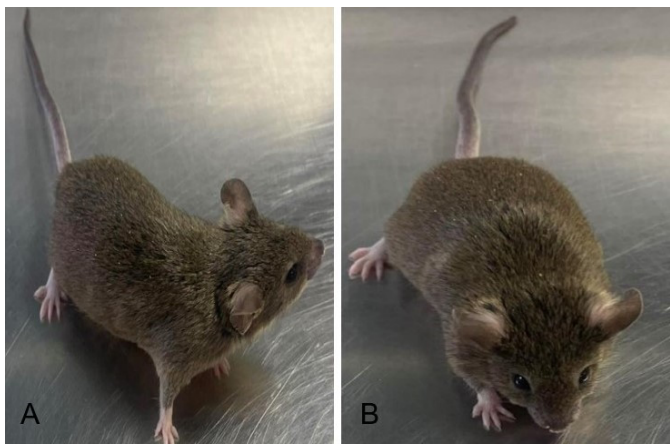
Mutacje *TSC* i nadaktywność szlaku mTORC1 wiążą się z rozwojem stwardnienia guzowatego (ang. *tuberous sclerosis complex*, SG), określanego także chorobą Bourneville’a-Pringle’a [4]. To autosomalny dominujący zespół, który

charakteryzuje się deficytami neurorozwojowymi i obecnością łagodnych guzów.

DELECCJA GENÓW *TSC* A AKTYWACJA SZLAKU MTOR

Inaktywacja mutacji punktowych w genach *TSC-1* lub *TSC-2* aktywuje kanoniczną ścieżkę sygnałową kompleksu mTORC-1. Reaktywacja szlaku mTORC-1 poprzez absencję genu *TSC1* w dojrzałych neuronach indukuje regenerację aksonów. Wykazano, że utrata funkcji mTORC-1 w komórkach Schwanna (SC) hamuje mielinizację włókien nerwowych [4].

Szereg badań wykazał, iż genetyczna aktywacja szlaku mTORC-1, silnego regulatora metabolizmu komórkowego jak i procesu translacji, wzmacnia regenerację aksonów neuronów obwodowych [5,53]. Wyniki badań Carlin i wsp. (2019) wykazały, że deleccja genu *TSC-2* w nocycceptorach (definiowanych jako receptory bólowe) po zmiążdżeniu nerwu kulszowego, początkowo w pierwszych dniach zwiększyła wzrost aksonu. Analiza ekspresji genów potwierdziła, że nocycceptory z absencją genu *TSC-2* cechowały się nadekspresją czynników transkrypcyjnych związanych z regeneracją. Ponadto, deleccja *TSC-2* aktywowała komórki glejowe i makrofagi w zwojach korzeni grzbietowych. Warto jednak zaznaczyć, że neuronalna aktywacja mTORC-1 poprawia początkowy, lecz nie późniejszy wzrost aksonów po uszkodzeniu nerwu [5]. Wyniki innego badania Carlin i wsp. (2018), dowodzą, że jednak nadmierna aktywacja mTORC1 może rozwijać defekty unerwienia, zmniejszoną wrażliwość na ciepło, czy zmniejszoną nadwrażliwość na zimno, wywołane urazem. Wrażliwość na bodźce mechaniczne nie ulega zmianie [53]. Z kolei zwiększona aktywność mTOR w wyniku zahamowania ekspresji *TSC2* zależna od rapa-



Rycina 6. Fotografia przedstawiająca fenotyp myszy TSC – 1. (Linia myszy: 129S4/SvJae Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA).

mycyny, warunkuje poszerzenie kolców dendrytycznych [54]. Warto również zaznaczyć, iż aktywacja mTOR w wyniku delecji *TSC2* zwiększa ekspresję białka GAP-43, określonego białkiem „wzrostu” bądź „plastyczności”, ze względu na jego syntezę w stożkach wzrostu neuronu w trakcie rozwoju i regeneracji aksonów [55]. Namiko i wsp. dowiedli, iż delecja *TSC2* wzmacnia regenerację aksonów zmiążdżonego mysiego nerwu kulszowego. W celu zobrazowania i monitorowania regenerujących, uszko-

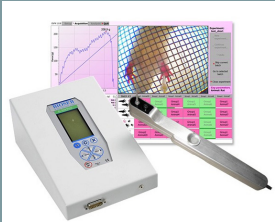

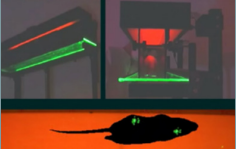

dzonych aksonów zastosowano białko GAP-43. Wyniki potwierdziły, że ekspresja GAP-43 jest o połowę mniejsza w porównaniu do obserwowanego miejsca zmiążdżenia. Sugeruje się, że zwiększona aktywność szlaku mTOR jest wystarczająca dla przyśpieszenia procesu regeneracji aksonów *in vivo*. Zakłada się więc, że szlak mTOR reguluje ekspresję GAP-43 [55].

Biorąc pod uwagę powyższe, zasadnym jest wykorzystywanie mutantów *TSC* w przyszłych badaniach, dotyczących molekularnych mechanizmów regeneracji układu nerwowego, ze względu na wzmocnienie regeneracji aksonów. Fenotyp myszy TSC – 1 przedstawia poniższa rycina 6.

PRZEGLĄD URZĄDZEŃ WYKORZYSTYWANYCH W TESTACH BEHAVIORALNYCH, SŁUŻĄCYCH OCENIE FUNKCJI LOKOMOTORYCZNYCH

Analizując proces regeneracji nerwów obwodowych, oprócz oceny ekspresji neurotrofin, bierze się również pod uwagę powrót funkcji lokomotorycznych badanego zwierzęcia. W tym celu w doświadczeniach eksperymentalnych wykorzystuje się testy behawioralne. Gryzonie są powszechnie wykorzystywane do badania patofizjologicznych mechanizmów bólu. Tabela 3 przedstawia kilka podstawowych testów, które znajdują swoje zastosowanie w ocenie powrotu funkcji lokomotorycznych.

Tabela 3. Urządzenia wykorzystywane w testach behawioralnych.

Nazwa urządzenia	Opis działania	Zdjęcie poglądowe
Elektroniczny włos von Frey’a	Narzędzie służące do pomiaru odruchu cofania łapy gryzonia, w momencie jego dotknięcia. Włos wykorzystywany jest do oceny poziomu allodyni mechanicznej i czucia skórnoego. Umożliwia ocenę bólu neuropatycznego powstałego na skutek uszkodzenia nerwu obwodowego. Poprzez zastosowanie „włosów” o zmiennej gramaturze możliwe jest potwierdzenie obecności lub braku mechanicznej allodyni. Reakcja zwierzęcia mierzona jest w czasie i rejestrowana jako podniesienie łapy. Służy również do wykrywania zaburzeń neurologicznych, między innymi neuropatii obwodowej czy uszkodzenia nerwów obwodowych [11,12].	 <p>mat. producenta BIOSEB</p>
Hot – Cold Plate	Badanie Hot-Cold Plate polega na analizie czucia u zwierząt po zadziałaniu bodźca termicznego. Zwierzę jest umieszczone na płycie a jego reakcje na zmianę temperatury są monitorowane. Metalową płytkę można ogrzać do temperatury 65 °C i schłodzić do -3 °C. Płyta grzewcza ocenia reakcję bólową zwierzęcia i może być wykorzystywana w celu zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych związanych z bólem, neuropatią czy chorobami neurodegeneracyjnymi [56].	 <p>mat. producenta BIOSEB</p>
CatWalk	System oparty na analizie parametrów związanych z chodem gryzonia przed i po urazie. Służy do oceny chodu, dynamiki chodu i innych parametrów ruchowych zwierzęcia. Powszechnie stosowany w badaniach naukowych związanych z regeneracją nerwu, neurodegeneracją, neurologią, neuropatią czy urazami rdzenia kręgowego [57].	 <p>mat. producenta NOLDUS</p>
Miernik siły chwytu „Grip strength”	Dokonyuje automatycznego pomiaru siły chwytu kończyn przednich i tylnych u szczurów i myszy. Może być wykorzystany w celu oceny wpływu leków, toksyn, starzenia bądź uszkodzeń nerwów [58,59].	 <p>mat. producenta BIOSEB</p>

PODSUMOWANIE

Regeneracja nerwu obwodowego, szczególnie po urazie, zależy od wielu czynników. Między innymi stopień uszkodzenia nerwu ma istotne znaczenie w procesie regeneracji. W sytuacji niewielkich uszkodzeń typu *neurapraxia* nerwy cechują się większą zdolnością samonaprawy. W przypadku bardziej poważnych uszkodzeń, związanych z przerwaniem ciągłości nerwu, proces regeneracji jest dłuższy i bardziej skomplikowany. Kolejnym czynnikiem, wpływającym na szybkość powrotu funkcjonalnego, może być wiek oraz czas jaki upłynął od momentu uszkodzenia. Dane literaturowe dowodzą, że zwyrodnienie Wallera w nerwie kulszowym i ekspresja wzrostu nerwu u młodych myszy (w porównaniu do osobników starszych) po uszkodzeniu nerwu kulszowego metodą zmiżdżenia osiągała wyraźną tendencję wzrostową [60]. Wykorzystując modele transgeniczne w medycynie i neurobiologii można stymulować wzrost i regenerację uszkodzonych nerwów poprzez ocenę ekspresji neurotrofin. Przykładowo, czynnik wzrostu nerwów, NGF (ang. *nerve growth factor*) cechuje się istotnymi właściwościami terapeutycznymi: u pacjentów z jaskrą, gwałtownym wrodzonym, makulopatią siatkówki, a także podawany miejscowo na ludzkie odleżyny skóry, stymuluje procesy regeneracji [61]. Badania eksperymentalne dowodzą, że czynniki neurotroficzne odgrywają także istotną rolę w regeneracji nerwu kulszowego. Li i wsp. [62] wykazała, że czynnik wzrostu nerwu pełni kluczową rolę w odbudowie i regeneracji obwodowych włókien nerwowych, tym samym promując regenerację aksonów. W badaniu doświadczalnym wykorzystano szczurzy model z uszkodzeniem nerwu kulszowego po zmiżdżeniu, gdzie podano egzogenne wolny roztwór NGF. Potwierdzono, że NGF aktywuje autofagię w odróżnionych komórkach Schwanna, oraz intensyfikuje regenerację aksonów i mielinę [62].

Podsumowując, w najbliższym czasie można spodziewać się jeszcze większego rozwoju technik kontroli ekspresji genów w zwierzętach transgenicznych. Manipulacja aktywnością szlaku mTOR może zapewnić nowe strategie intensyfikowania regeneracji nerwów obwodowych. Mysi model z delecją genu *TSC*, pomimo, że w literaturze nie odnajdujemy aktualnie tak szerokiego zastosowania w ocenie powrotu funkcji lokomotorycznych po urazach nerwu kulszowego, w przyszłości może jednak stanowić obiecującą perspektywę, ze względu na wzmocnienie regeneracji aksonów i mielinizacji. Dodatkowo, kompleks rapamycyny 1 (mTORC1) reguluje szlaki wzrostu komórek, a jego aktywacja genetyczna jest wystarczająca do wzmocnienia mechanizmów regeneracyjnych neuronów, po uszkodzeniu ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Pigońska J, Bogucki A (2015) Pourazowe uszkodzenia nerwów obwodowych – diagnostyka elektrofizjologiczna. *Family Medicine & Primary Care Review* 4: 334–337
2. Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 285(36): 28034–43
3. Park K, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (2008) *Science* 322: 963–966
4. Jaworski J (2021) Rapamycyna – skarb neurobiologów z wyspy wielkanocnej. *Wszechświat* 122: 25–32

5. Grabańska-Martyńska K, Hoffmann K, Buda D, Moskalik-Koberling E, Walczak M (2018) Stwardnienie guzowate – opis przypadku. *Via Medica Forum Zaburzeń Metabolicznych* 9: 95–167
6. Seddon HJ A Classification of Nerve Injuries (1942) *Br Med J* 29;2(4260): 237–9
7. Trzęsicki M, Białoń N, Kuźma D, Górka D (2022) Białka z rodziny Bcl-2 oraz neurotrofyny jako istotny czynnik decydujący o przeżywalności neuronów obwodowych u zwierząt transgenicznych. *Postępy Biochem* 68(4): 381–386
8. Sunderland S. *Nerve Injuries and Their Repair* (1991) A Critical Appraisal. New York: Churchill Livingstone
9. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC (2015) Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery *Hand Clin* 317–330
10. Kusunoki S (2014) How is the blood-nerve barrier involved in the pathogenetic mechanisms of multifocal motor neuropathy? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85: 473
11. Umansky D, Hagen KM, Chu TH, Pathiyil RK, Alzahrani S, Ousman SS, Midha R (2022) Functional Gait Assessment Using Manual, Semi-Automated and Deep Learning Approaches Following Standardized Models of Peripheral Nerve Injury in Mice. *Biomolecules* 12(10): 1355
12. Mahan MA, Warner WS, Yeoh S, Light A (2019) Rapid-stretch injury to peripheral nerves: implications from an animal model. *J Neurosurg* 4: 1–11
13. Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS (2001) Functional Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Rat: Walking Track Analysis. *J Neurosci Methods* 108: 1–9
14. Alant JDDV, Kemp SWP, Khu KJOL, Kumar R, Webb AA, Midha R (2012) Traumatic Neuroma in Continuity Injury Model in Rodents. *J Neurotrauma* 29: 1691–1703
15. Alant JDV, Senjaya F, Ivanovic A, Forden J, Shakhbazau A, Midha R (2013) The Impact of Motor Axon Misdirection and Attrition on Behavioral Deficit Following Experimental Nerve Injuries. *PLoS One* 8: 82546
16. Imran M, Hussain G, Hameed A, Iftikhar I, Ibrahim M, Asghar R, Nisar I, Farooq T, Khalid T, Rehman K, Assiri MA (2022) Metabolites of Moringa oleifera Activate Physio-Biochemical Pathways for an Accelerated Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Mice. *Metabolites* 12: 1242
17. Bauder AR, Ferguson TA (2012) Reproducible mouse sciatic nerve crush and subsequent assessment of regeneration by whole mount muscle analysis. *J Vis Exp* (60): 3606
18. Zhang T, Li Z, Dong J, Nan F, Li T, Yu Q (2014) Edaravone promotes functional recovery after mechanical peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* 15: 1709–15
19. Savastano L, Laurito R, Fitt M, Rasmussen J, Polo V, Patterson S (2014) Sciatic nerve injury: A simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J Neurosci Methods* 227: 166–180
20. Myers RR, Heckman HM, Powell HC (1996) Axonal viability and the persistence of thermal hyperalgesia after partial freeze lesions of nerve. *J Neurol Sci* (1): 28–38
21. Jia J, Pollock M (1997) The pathogenesis of non-freezing cold nerve injury. Observations in the rat. *Brain* 4: 631–46
22. Li H, Jia JP, Xu M, Zhang L (2015) Changes in the blood-nerve barrier after sciatic nerve cold injury: indications supporting early treatment. *Neural Regen Res* 10: 419–24
23. Ubogu EE (2013) The molecular and biophysical characterization of the human blood-nerve barrier: current concepts. *J Vasc Res* 50: 289–303
24. Yosef N, Ubogu E (2013) An immortalized human blood-nerve barrier endothelial cell line for in vitro permeability studies. *Cell Mol Neurobiol* 33: 175–186
25. Badalamente MA, Hurst LC, Stracher A (1995) Neuromuscular recovery after peripheral nerve repair: Effects of an orally-administrated peptide in a primate model. *J Reconstr Microsurg* 11: 429–437

26. Blesch A, Lu P, Tsukada S, Alto L.T, Roet K, Coppola G, Geschwind D, Tuszynski MH (2012) Conditioning lesions before or after spinal cord injury recruit broad genetic mechanisms that sustain axonal regeneration: Superiority to camp-mediated effects. *Exp Neurol* 235: 162-173
27. Wróbel A (2002) *Neurobiologia*. Warszawa: PWN
28. Ji W, Hou B, Tang H, Cai M, Zheng W (2020) Investigation of the effects of laminin present in the basal lamina of the peripheral nervous system on axon regeneration and remyelination using the nerve acellular scaffold. *J Biomed Mater Res A* 108: 1673-1687
29. Futoma K, Klimczak A (2018) Nerwiaki pourazowe przyczyną po-amputacyjnego bólu neuropatycznego: epidemiologia, mechanizmy i czynniki zaangażowane w powstawanie bólu. *Postepy Hig Med Dosw* 72: 937-952
30. Dubový P (2011) Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat* 193: 267-75
31. Bastien D, Lacroix S (2014) Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 258: 62-77
32. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci* 22: 3052-3060
33. Siqueira Mietto B, Kroner A, Girolami E.I, Santos-Nogueira E, Zhang J, David S (2015) Role of IL-10 in resolution of inflammation and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 35: 16431-16442
34. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS (2011) Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 8: 110
35. Mietto BS, Mostacada K, Martinez AM (2015) Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. *Mediat. Inflamm* 2015: 251204
36. Dieu T, Johnstone BR, Newgreen DF (2005) Genes and nerves. *J Reconstr Microsurg* 21: 179-186
37. Blesch A, Lu P, Tsukada S, Alto LT, Roet K, Coppola G, Geschwind D, Tuszynski MH (2012) Conditioning lesions before or after spinal cord injury recruit broad genetic mechanisms that sustain axonal regeneration: Superiority to camp-mediated effects. *Exp Neurol* 235: 162-173
38. Akram R, Anwar H, Javed MS, Rasul A, Imran A, Malik SA, Raza C, Khan IU, Sajid F, Iman T, Sun T, Han HS, Hussain G (2022) Axonal Regeneration: Underlying Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Biomedicines* 10: 3186
39. Cui W, Wu H, Yu X, Song T, Xu X, Xu F (2021) The Calcium Channel A2 δ 1 Subunit: Interactional Targets in Primary Sensory Neurons and Role in Neuropathic Pain. *Front Cell Neurosci* 15: 397
40. Kummer KK, Zeidler M, Kalpachidou T, Kress M (2021) Role of IL-6 in the Regulation of Neuronal Development, Survival and Function. *Cytokine* 144: 155582
41. Li X, Wang S, Yang X, Chu H (2021) MiR-142-3p Targets AC9 to Regulate Sciatic Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain by Regulating the CAMP/AMPK Signalling Pathway. *Int. J. Mol. Med* 47:561
42. Gao J, Gu J, Pan X, Gan X, Ju Z, Zhang S, Xia Y, Lu L, Wang X (2019) Blockade of MiR-142-3p Promotes Anti-Apoptotic and Suppressive Function by Inducing KDM6A-Mediated H3K27me3 Demethylation in Induced Regulatory T Cells. *Cell* 10: 332
43. Ulińska E, Matysiak M (2015) Aspekty kliniczne znaczenia kinazy mTOR w patogenezie ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci. *Journal of Transfusion Medicine* 8: 43-48
44. Perycz M, Świech Ł, Malik A, Jaworski J (2007) mTOR w fizjologii i patologii układu nerwowego. *Postepy Biologii Komórki* 34: 511-525
45. Gabryel B, Kapałka A, Sobczyk W, Łabuzek K, Gawęda A, Janas-Kozik M (2014) Dysregulacja szlaku sygnałowego mTOR w patogenezie zaburzeń ze spektrum autystycznego. *Postepy Hig Med Dosw* 68: 375-383
46. Dębowska A, Józwiak S (2015) Dysregulacja szlaku mTOR i rola rapamycyny i jej analogów w leczeniu chorób neurologicznych. *Child Neurology* 48: 9-13.
47. Bateman JM, McNeill H (2004) Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in *Drosophila*. *Cell* 119: 87-96
48. Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34: 205-219
49. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (2005) Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25: 11300 - 11312
50. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005) Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25: 11288-11299
51. Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ (2006) Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J Neurosci* 26: 12977-12983
52. Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 87: 303-7
53. Carlin D, Golden JP, Mogha A, Samineni VK, Monk KR, Gereau RW 4th, Cavalli V (2018) Deletion of Tsc2 in Nociceptors Reduces Target Innervation, Ion Channel Expression, and Sensitivity to Heat. *eNeuro* 3: 5
54. Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8:1727-1734
55. Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 285: 28034-43
56. Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, Barrot M, Poisbeau P (2009) Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain* 10: 767-73
57. Heinzel J, Längle G, Oberhauser V, Hausner T, Kolbenschlag J, Prahm C, Grillari J, Hercher D (2020) Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. *J Neurosci Methods* 345: 108889
58. Montilla-García Á, Tejada MÁ, Perazzoli G, Entrena JM, Portillo-Salido E, Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cobos EJ (2017) Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology* 125: 231-242
59. Imran M, Hussain G, Hameed A, Iftikhar I, Ibrahim M, Asghar R, Nisar I, Farooq T, Khalid T, Rehman K, Assiri MA (2022) Metabolites of *Moringa oleifera* Activate Physio-Biochemical Pathways for an Accelerated Functional Recovery after Sciatic Nerve Crush Injury in Mice. *Metabolites* 12: 1242
60. Obata H, Naito K, Kikui A, Nakamura S, Suzuki K, Kawakita S, Suzuki T, Goto K, Nagura N, Sugiyama Y, Nagaoka I, Ishijima M (2022) Agerelated differences for expression of the nervespecific proteins after peripheral nerve injury. *Exp Ther Med* 24: 682
61. Rocco ML, Soligo M, Manni L, Aloe L (2018) Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials. *Curr Neuropharmacol* 16: 1455-1465
62. Li R, Li D, Wu C, Ye L, Wu Y, Yuan Y, Yang S, Xie L, Mao Y, Jiang T, Li Y, Wang J, Zhang H, Li X, Xiao J (2020) Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration. *Theranostics* 10: 1649-1677

The mTOR pathway and transgenic animals with deletion of the TSC gene in the regeneration of the nervous system and selected models of sciatic nerve damage.

mgr Natalia Białoń^{1,2}✉, dr Krzysztof Suszyński¹, mgr Mikołaj Górka^{2,3}, dr Michał Trzęsicki¹, dr hab. Dariusz Górka¹, Agata Kupczak¹

¹Department of Sports Medicine and Physiology of Physical Exercise, Faculty of Health Sciences in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice

²Doctoral School of the Medical University of Silesia in Katowice

³Center of Experimental Medicine of the Medical University of Silesia in Katowice

✉corresponding author: d201080@365.sum.edu.pl

Key words: mammalian target of rapamycin, mTOR, TSC, sciatic nerve regeneration, neurotrophins, neuroplasticity

ABSTRACT

Traumatic damage to the nervous system has been a common occurrence for years, reducing patients' quality of life. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway plays a key role in nervous system physiology, including by controlling nerve cell survival and differentiation. Excessive activation of the mTOR pathway leads to an increase in cell cycle protein activity and apoptosis of nerve cells. Moreover, current findings suggest the involvement of the mTOR pathway in neuroplasticity. The use of transgenic animals with deletion of the TSC gene as well as various models of sciatic nerve damage, allows activation of the mTOR pathway. Currently, the results confirm that inactivation of point mutations in TSC-1 or TSC-2 genes, activates the canonical signaling pathway of the mTORC-1 complex, in turn, reactivation of the mTORC-1 pathway through the absence of the TSC-1 gene in mature neurons induces axonal regeneration. Dysfunction of the mTORC-1 pathway in Schwann cells inhibits myelination of nerve fibers. The aim of the present study is to understand the physiology and role of the mTOR pathway as well as to demonstrate the impact of TSC gene deletion in the regeneration of the nervous system. Current research on the activity of the mTOR pathway may provide new strategies to intensify peripheral nerve regeneration.

