

Ocena procesu regeneracji nerwu kulszowego mysiego modelu zwierzęcego po zastosowaniu uszkodzenia metodą mrożenia, zmiżdżenia lub elektrokoagulacji

STRESZCZENIE

Problem regeneracji uszkodzonych nerwów obwodowych jest tematem aktualnym i od dawna przedmiotem intensywnych badań na całym świecie. Badania zaprezentowane w niniejszym artykule dotyczyły oceny morfologicznej i funkcjonalnej procesu regeneracji w obrębie uszkodzonego nerwu kulszowego mysiego modelu zwierzęcego. Ocenie poddano wpływ zaburzonej ekspresji genu *TSC-1* na proces regeneracji nerwu, w zależności od sposobu uszkodzenia. Obiekt badawczy stanowiło 48 dwumiesięcznych samców linii TSC. Grupę badawczą stanowiły zwierzęta, które poddano uszkodzeniu nerwu kulszowego metodą zmiżdżenia, mrożenia lub elektrokoagulacji, z kolei grupa kontrolna obejmowała myszy, u których nerw kulszowy nie został poddany uszkodzeniu. W celu oceny szybkości powrotu funkcjonalnego kończyny przeprowadzono testy behawioralne po upływie 3, 5, 7 i 14 dni od uszkodzenia. Pierwsze zmiany w procesie regeneracji uszkodzonego neurytu obserwowano już w 3 dobie po uszkodzeniu, natomiast w 14 dobie od momentu uszkodzenia zauważono powrót do funkcjonalności uszkodzonej kończyny.

WPROWADZENIE

Obwodowy układ nerwowy uczestniczy w przekazywaniu bodźców pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym a strukturami znajdującymi się na obwodzie organizmu. Cechuje się on zdolnością do samoistnej regeneracji po urazowym uszkodzeniu, które stanowią łącznie od 2 do 3% wszystkich urazów nerwów, jednak pełny powrót funkcjonalny jest ograniczony [1]. Wśród przyczyn uszkodzeń nerwów obwodowych wyróżnia się: wypadki drogowe (między innymi w rolnictwie czy sporcie), wypadki komunikacyjne, obrażenia ostrymi przedmiotami, złamania kości długich, infekcje, bądź choroby autoimmunologiczne [2,3]. W celu powrotu funkcji kończyny po uszkodzeniu nerwu niezbędna jest rehabilitacja, zabiegi fizykalne, hydroterapia, kinezyterapia, czy aktywność fizyczna [4]. Na przełomie ostatnich lat literatura przedstawia korzystną rolę treningu fizycznego w regeneracji uszkodzonego neurytu, który po uszkodzeniu nerwu obwodowego przyczynia się do transportu m.in. czynników neurotroficznych, mających szczególne znaczenie w procesie odbudowy i regeneracji uszkodzonego neurytu. Neurotrofiny regulują przeżycie, rozwój a także funkcje tkanki nerwowej [5]. Mózgowy czynnik pochodzenia nerwowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) jest dobrze poznana i opisywaną neurotrofiną uczestniczącą w procesie regeneracji nerwu [6]. Wyniki badań naukowych prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że niewymuszone, spontaniczne ćwiczenia w kołowrotku przez okres tylko 3 i 7 dni doprowadziły do wyraźnego zwiększenia szybkości przyrostu neurytów, a także do wzrostu liczby neuronów czuciowych regenerujących po urazie nerwu kulszowego. Zwierzęta, które zostały poddane treningowi lokomotorycznemu, cechowały się wyższym poziomem neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego w porównaniu do zwierząt nietrenowanych [7]. U zwierząt po urazie nerwu kulszowego efektem treningu był wzrost ekspresji BDNF i NT-3 (ang. *neurotrophin-3*, NT-3) w zwojach czuciowych, a także zaobserwowano zwiększony poziom synapsyny I i GAP-43 (ang. *growth-associated protein 43*) [7].

Współcześnie, w dyscyplinie nauk genetycznych, pojawiają się doniesienia na temat wpływu zależności zaburzonej ekspresji genów TSC (ang. *tuberous sclerosis complex*) a procesem regeneracji nerwu obwodowego. Znaczenie szlaku mTOR w regeneracji nerwu obwodowego obecnie poddawane jest intensywnym badaniom. Najnowsze odkrycia naukowe potwierdzają, że aktywacja szlaku mTOR poprzez delekcję genów TSC odgrywa istotną rolę w procesie regeneracji nerwów obwodowych, stymulując wzrost aksonów [8-10]. W celu wytłumaczenia roli szlaku mTOR, w badaniach doświadczalnych wykorzystuje się zwierzęta transgeniczne linii TSC. Mysie modele są często wykorzystywane jako narzędzie badawcze, ponieważ cechuje je krótki cykl życiowy, łatwość utrzymania hodowli i niskie koszty. Model zwierzęcy jest jedynym dostępnym modelem praktycznym

dr hab. n. o zdr. Dariusz Górka¹,

dr n. med. Krzysztof Suszyński¹,

mgr Natalia Białoń^{1,2}✉,

mgr Mikołaj Górka^{2,3},

dr n. o zdr. Michał Trzęsicki¹,

Kacper Zajac¹,

mgr Anna Dolińska¹,

lek. Filip Tomsia¹

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_504

✉ autor korespondujący: natalia.bialon@sum.edu.pl

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

Wykaz skrótów: BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego(ang. *brain-derived neurotrophic factor*); GAP-43 – białko związane ze stożkami wzrostu 43 (ang. *growth-associated protein 43*); GFAP – kwaśne białko fibrylarne gleju (ang. *glial fibrillary acidic protein*); NT-3 – neurotrofina 3 (ang. *neurotrophin 3*); mTOR – ssaczy cel rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*); TSC – kompleks stwardnienia guzowego (ang. *tuberous sclerosis complex*)

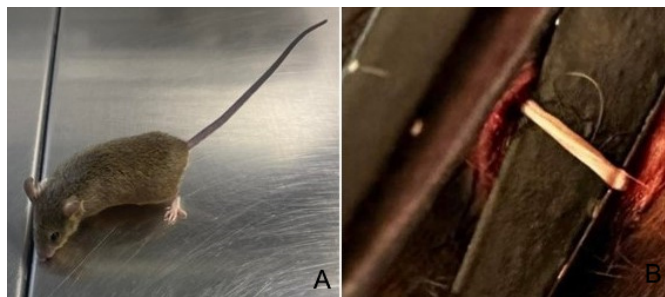
umożliwiający ocenę procesu regeneracji jak i powrotu funkcjonalnego oraz pozwala na przełożenie uzyskanych wyników na pacjenta, w obszar badań klinicznych. W eksperymentach najczęściej wykorzystuje się myszy bądź szczurzy nerw kulszowy ze względu na jego długość. Jest jednym z najdłuższych nerwów człowieka, co oznacza, iż unerwia obszar, który poddaje się eksperymentom i obserwacją. Dodatkowo pełni kluczową funkcję w odbiorze czucia oraz lokomocji dolnych części ciała, stąd jego uszkodzenie może doprowadzać do rozwoju deficytów neurologicznych, co poddaje się ocenie przy wykorzystaniu testów behawioralnych. Ponadto, jest łatwy w preparowaniu i manipulacji co umożliwia przeprowadzenie badań eksperymentalnych.

Celem podjętych badań była:

- Ocena morfologiczna i funkcjonalna procesu regeneracji w obrębie uszkodzonego nerwu kulszowego myszy.
- Określenie wpływu zaburzonej ekspresji genu *TSC-1* na proces regeneracji nerwu kulszowego, w zależności od sposobu uszkodzenia.
- Ocena i porównanie powrotu funkcji uszkodzonej kończyny po upływie 3, 5, 7 i 14 dni od uszkodzenia.

MATERIAŁ I METODY

Praca stanowi kontynuację artykułu przeglądowego o tematyce "Szlak mTOR i zwierzęta transgeniczne z delecją genu *TSC* w procesie regeneracji układu nerwowego i wybranych modelach uszkodzeń nerwu kulszowego". Niniejsze badania powstały w ramach pracy statutowej o numerze PCN-1-206/N/O/Z. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach nr 43/2023 z dnia 20.07.2023. Rycina 1A przedstawia materiał badawczy, który obejmował 48 sztuk dwumiesięcznych myszy, samców linii TSC (129S4/SvJae Jackson Laboratory). Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta zostały zważone, w tym celu pojedyncze zwierzę było umieszczane na wadze laboratoryjnej. W pierwszej grupie badawczej średnia masa myszy wynosiła $22,3 \pm 1,85$ g (20,01–26,20 g), w drugiej grupie badawczej średnia masa wynosiła $22,08 \pm 1,97$ g (19,01–23,67 g), z kolei w grupie trzeciej uzyskano średnią masę $19,77 \pm 2,48$ g (18,02–22,67 g). W grupie kontrolnej odnotowano średnią masę $19,52 \pm 2,84$ g (18,04–23,01 g). Ze względu na wprowadzone modyfikacje genetyczne badanych zwierząt, niezbędne było ich genotypowanie, celem potwierdzenia obecności wprowadzonych mutacji. Genotypy wszystkich badanych myszy potwierdzono za pomocą reakcji PCR. DNA do reakcji PCR izolowano z końcówki ogona myszy. Wszystkie zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach, o cyklu oświetlenia 12/12, w temperaturze 25°C oraz wilgotności względnej 59–69%. Zwierzęta miały dostęp *ad libitum* do wody oraz pokarmu. Myszy podzielono na 4 grupy, a liczebność każdej z nich wynosiła 12 sztuk. Pierwszą grupę badawczą stanowiły zwierzęta, które poddano uszkodzeniu nerwu kulszowego metodą mrożenia. W drugiej grupie nerw poddano zmiążdżeniu przy użyciu klipsa naczyniowego a następnie zastosowano klej fibrynowy w celu zespolenia uszkodzonego neurytu. W trzeciej grupie myszy nerw kulszowy podda-

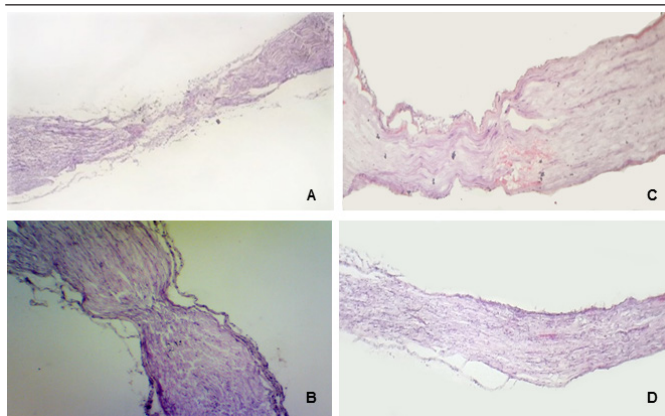


Rycina 1. Fotografia przedstawiająca fenotyp myszy TSC-1 (A). Linia myszy: 129S4/SvJae Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA. Wypreparowany nerw kulszowy myszy linii TSC-1, fotografia wykonana przed uszkodzeniem (B), źródło: materiały własne.

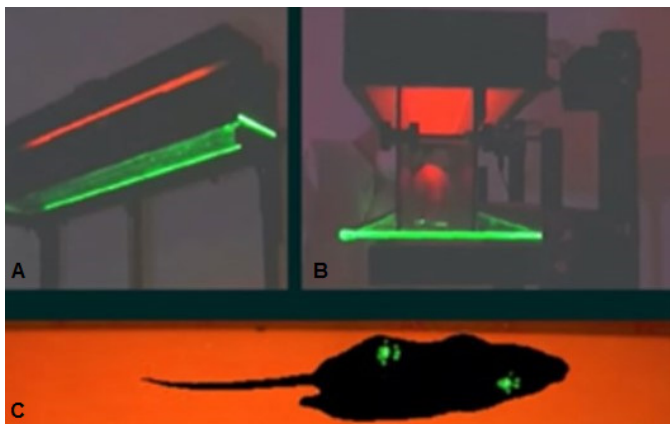
no elektrokoagulacji, z kolei w grupie czwartej znajdowały się myszy, u których nerw kulszowy nie uległ uszkodzeniu i stanowiły one próbę kontrolną. W każdej grupie przeprowadzono test behawioralny w celu oceny powrotu funkcjonalnego kończyny, po upływie 3 dnia (n=3), 5 dnia (n=3), 7 dnia (n=3) i 14 dnia (n=3) od momentu uszkodzenia. Ocenę funkcjonalną przeprowadzono za pomocą skomputeryzowanego systemu do analizy chodu u myszy i szczurów CatWalk XT firmy Noldus. Zabiegi były wykonywane w warunkach sali operacyjnej, zwierzę wprowadzono w stan znieczulenia ogólnego dootrzewnowego ketaminą w dawce 100 mg/kg masy ciała i ksylazyną w ilości 10 mg/kg masy ciała. W warunkach aseptycznych, po ogoleniu i odkażeniu skóry, na zewnętrznej powierzchni prawego uda myszy nacięta została skóra o długości nacięcia 1 cm. Następnie nerw kulszowy zostaje odsłonięty przy wykorzystaniu narzędzi chirurgicznych i preparowany na "tępo" (Ryc. 1B przedstawia wypreparowany nerw kulszowy przed uszkodzeniem), po czym następowało jego uszkodzenie opracowaną techniką. Rana została zaopatrzona nićmi chirurgicznymi firmy NOVOSYN, rozmiar 2/0. Poniżej opisano sposób wykonania wybranych modeli uszkodzeń nerwu kulszowego.

MROŻENIE NERWU KULSZOWEGO

Wypreparowany nerw odsłonięto, a następnie miejscowo przyłożono aplikator o czasie trwania 35 sekund, w



Rycina 2. Fotografie mikroskopowe nerwu kulszowego myszy uszkodzonego metodą mrożenia (A), zmiążdżenia (B) oraz elektrokoagulacji (C), w odniesieniu do grupy kontrolnej (D). Nerwy wybarwiono eozyną i hematoxyliną. W wyniku uszkodzenia metodą mrożenia (A) obserwuje się w przekroju, od góry zaburzoną ciągłość osłonki mielinowej, degenerację włókien nerwowych oraz rozległe uszkodzenie. Przekrój nerwu nieuszkodzonego (D) obrazuje zachowaną ciągłość osłonki mielinowej oraz równoległe ułożone pasma neurytu (źródło: materiały własne).



Rycina 3. Fotografia przedstawia mysz w trakcie analizy chodu z wykorzystaniem urządzenia CatWalk (źródło: mat. producenta NOLDUS). (A) Urządzenie CatWalk XT 9.1. (B) Mysz w trakcie poruszania się w wąskim tunelu. (C) Obraz pokazujący zrzut z ekranu komputera w trakcie analizy chodu z CatWalk. Kamera znajdująca się pod szklaną płytą rejestruje oświetlone obszary.

odległości około 5 mm przed trifurkacją – miejscem podziału nerwu na nerw strzałkowy, piszczelowy i łydkowy. Zgodnie z informacją producenta, zastosowanie aplikatora wykorzystującego metodę zamrażania ciekłym azotem pozwoliło uzyskać temperaturę -50°C . Rycina 2 przedstawia uszkodzony nerw metodą mrożenia (Ryc. 2A), jak i nerw przed uszkodzeniem (Ryc. 2D).

USZKODZENIE NERWU KULSZOWEGO METODĄ ZMIAŻDŻENIA Z ZASTOSOWANIEM KLEJU FIBRYNOWEGO

Wypreparowany nerw zmiażdżono przy pomocy klipsa naczyniowego Yasargil Aneurysm Clip mini temporary o sile nacisku 70,0 gms/0,69 N, a następnie naniesiono w miejsce zmiażdżenia krople kleju fibrynowego, w celu zespolenia uszkodzonych włókien nerwowych (Ryc. 2B). Po upływie kilku minut rana została zaopatrzona szwami.

ELEKTROKOAGULACJA NERWU

Elektrokoagulacja jest metodą wykorzystującą prąd elektryczny wysokiej częstotliwości, która prowadzi do denaturacji nerwu, a następnie jego odparowania. W celu uszkodzenia nerwu zastosowano elektrokoagulator o mocy koagulacji 35 W, w odległości około 5 mm przed trifurkacją (Ryc. 2C).

TEST FUNKCJONALNY Z WYKORZYSTANIEM URZĄDZENIA CATWALK

Testy z wykorzystaniem CatWalk (Ryc. 3A) przeprowadzone były kolejno w grupie badawczej oraz kontrolnych: jednokrotnie przed operacją nerwu obwodowego oraz 3-krotnie; w trzecim, piątym, siódmym, oraz czternastym dniu od dnia uszkodzenia. W trakcie każdego badania uzyskano co najmniej trzy zgodne przebiegi. Po klasyfikacji odcisków łap, każdy bieg był oceniany w zwolnionym tempie w celu sprawdzenia przebiegu ruchu myszy w czasie. Kryteria zgodności po przejściu obejmowały odrzucenie przebiegów, które wykazywały anomalie behawioralne (np. wachanie, zatrzymanie się) oraz takie, w których zauważalne było odchylenie od poruszania się w trakcie swo-

bodnej lokomocji (np. przyspieszenie lub hamowanie). Celem testów przeprowadzonych przed uszkodzeniem nerwu obwodowego było wyznaczenie indywidualnych wartości oraz norm dla każdego zwierzęcia oraz przyzwyczajenie do warunków. Zwierzę poruszało się swobodnie w wąskim korytarzu (4 x 44 cm, Ryc. 3B), pod podłogą którego była umieszczona kamera cyfrowa (100 klatek na sekundę), filmy zapisane zostały w formacie AVI (Audio Video Interleaved). Dzięki specjalnej konstrukcji przezroczystej podłogi oraz zastosowania specjalnego systemu oświetlenia uwidocznione zostały ślady odcisków łap myszy (Ryc. 3C), które przedstawiono graficznie w podrozdziale Wyniki. W celu oceny powrotu funkcjonalnego uszkodzonej kończyny wybrano parametry, które odzwierciedlają powrót funkcjonalny i znajdują swoje zastosowanie także w literaturze. Badano następujące parametry:

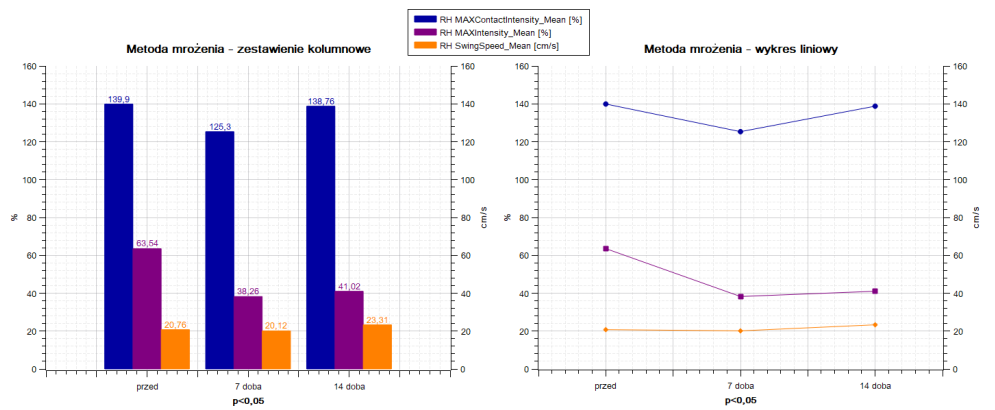
- Max Contact Mean Intensity [%] – średnia intensywność podczas maksymalnego kontaktu łapy z podłożem – średnia ze wszystkich zarejestrowanych odcisków łap,
- Max Intensity Mean [%] – maksymalna zarejestrowana intensywność śladu podczas kontaktu łapy z podłożem – średnia ze wszystkich zakwalifikowanych śladów,
- Swing Speed [cm/s] – prędkość przenoszenia łapy w powietrzu między zarejestrowanymi śladami.

WYNIKI I DYSKUSJA

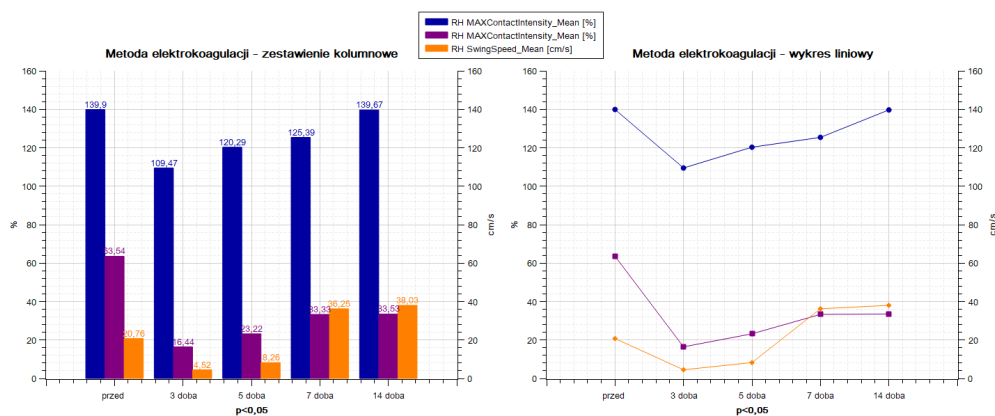
Poniżej przedstawiono wyniki analizy poszczególnych parametrów chodu uzyskane za pomocą systemu CatWalk (Ryc. 4, 5 i 6). Wykorzystując program QtiPlot policzono referencyjne wartości dla testu *t* – Studenta, dla poszczególnych serii danych następujących dni, względem próby wyjściowej. Pozwoliło to na wykreślenie ogólnego trendu i stwierdzenia wartości *p*-value na poziomie $<0,005$ dla wszystkich badanych parametrów. Uzyskane wyniki potwierdzają, że analiza jest istotna statystycznie.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że powrót funkcjonalny obserwuje się w każdej grupie badawczej, wraz z upływem czasu. Analizując metodę mrożenia w 3 i 5 dobie od momentu uszkodzenia nerwu niską temperaturą, nie odnotowano dla żadnego parametru odbicia uszkodzonej łapy. Natomiast w 7 i 14 dobie obserwuje się stopniowy wzrost wszystkich badanych parametrów, co świadczy o powrocie funkcji uszkodzonej kończyny. Na Ryc. 7 graficznie przedstawiono częstotliwość odbicia łap, co stanowi potwierdzenie uzyskanego wyniku.

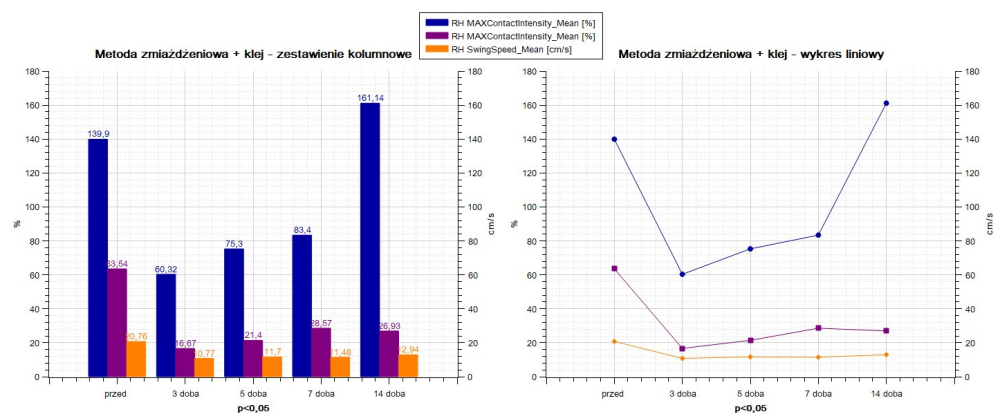
Przypuszcza się, że zaistniały brak kontaktu uszkodzonej łapy z podłożem w 3 i 5 dobie po eksperymencie (Ryc. 7A i B) może być związany z zastosowaniem zbyt dotkliwej procedury uszkodzenia nerwu. Autorzy opracowali własną metodę “indukcji zimnem”, w której mrozili nerw punktowo przez okres 30–40 sekund, temperaturą -50°C . W literaturze światowej istnieje niewiele opracowań dotyczących uszkodzenia nerwu kulszowego metodą mrożenia. Jednak wyniki badań Myers i wsp. [11] wykazały, że istniał bezpośredni związek między czasem trwania miejscowego mrożenia nerwu a intensywnością degenera-



Rycina 4. Analiza porównawcza wybranych parametrów systemu CatWalk. Uszkodzenie nerwu kulszowego metodą mrożenia. Opracowanie wyników przy pomocy programu QtiPlot.



Rycina 5. Analiza porównawcza wybranych parametrów systemu CatWalk. Uszkodzenie nerwu kulszowego poprzez elektrokoagulację. Opracowanie wyników przy pomocy programu QtiPlot.

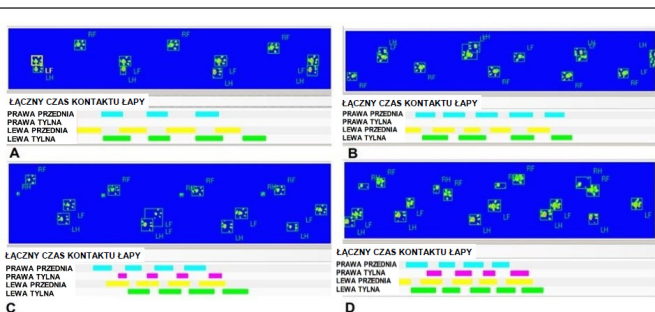


Rycina 6. Analiza porównawcza wybranych parametrów systemu CatWalk. Uszkodzenie nerwu kulszowego poprzez zmażdżenie klipsem nacyniowym z zastosowaniem kleju fibrynowego. Opracowanie wyników przy pomocy programu QtiPlot.

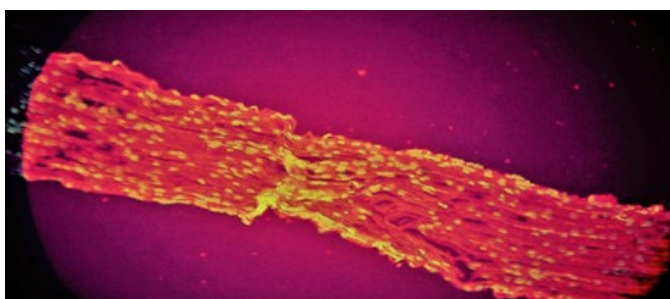
cji Wallera oraz liczbą uszkodzonych włókien nerwowych. Prawdopodobnie w pierwszych dniach po urazie (Ryc. 7A i B) nastąpił rozwój hiperalgezji (nadmiernej wrażliwości na ból), co związane było z brakiem kontaktu łapy z podłożem. W przyszłości warto więc sprawdzić, czy utrzymanie się hiperalgezji bezpośrednio koreluje z czasem trwania mrożenia nerwu [12].

Po uszkodzeniu nerwu metodą elektrokoagulacji w porównaniu do grupy kontrolnej, zdecydowanie można za-

uważyć tendencję spadkową wszystkich analizowanych parametrów. Wraz z upływem czasu, wzrasta częstotliwość kontaktu łapy z podłożem oraz prędkość przenoszenia łapy w powietrzu. Uzyskany wynik jest potwierdzeniem powrotu lokomotorycznego zwierzęcia, co przekłada się prawdopodobnie na regenerację uszkodzonego neurytu. Już w 14 dobie od momentu uszkodzenia, obserwuje się powrót wartości parametrów do początkowych z grupy kontrolnej (Ryc. 7D).



Rycina 7. Graficzne przedstawienie odcisków łap myszy – kolor różowy – rejestracja śladów łapy po uszkodzeniu. Zrzut ekranu z urządzenia CatWalk – źródło: materiały własne. RF – łapa prawa, przednia. RH – łapa prawa tylna (uszkodzona). LF – łapa lewa, przednia. LH – łapa lewa, tylna. Jeśli zwierzę wywiera większy nacisk w danym obszarze, to uzyskany obraz jest proporcjonalnie jaśniejszy – umożliwia to wykrycie nawet subtelnych różnic w nacisku pomiędzy poszczególnymi łapami. Wynik analizy chodu, uzyskany: w 3 dobie od momentu uszkodzenia (A), 5 dobie (B), 7 dobie (C) oraz po upływie 14 dni (D).



Rycina 8. Nalożone zdjęcia (barwienie metodą DAPI – kolor niebieski, ekspresja BDNF widoczny w kolorze czerwonym) z mikroskopu fluorescencyjnego. Powiększenie 200x. Źródło: materiały własne.

Podobne wyniki uzyskano analizując parametry po uszkodzeniu nerwu klipsem naczyniowym. Model zmiążdżenia nerwu kulszowego jest w literaturze najczęściej pojawiającym się modelem uszkodzenia [13-16]. Z obserwacji uprzednio wykonywanych podobnych zabiegów chirurgicznych wnioskuje się, że tego typu uszkodzenie nie powoduje znacznej dotkliwosci zwierzęcia, przy tym nie ograniczając jego lokomocji [17]. Autorzy dodatkowo zastosowali klej fibrynowy, który miał na celu zespolić (złączyć) zmiążdżone struktury neurytu. Model ten okazał się jednak najtrudniejszy do wykonania, ze względu na konieczną precyzję wynikającą z nałożenia kropli kleju wprost na miejsce zmiążdżenia, co w przypadku nerwu kulszowego myszy, ze względu na rozmiar nerwu, jest trudne do zrealizowania. Klej fibrynowy cechuje się pewnym ograniczeniem, gdyż bardzo szybko schnie, co powoduje szybkie sklejanie struktur sąsiadujących z nerwem. Jednak, pomimo trudności, procesy regeneracji miały miejsce, gdyż analizując parametry i uzyskane wyniki zaobserwowano powrót lokomotoryczny wraz z upływem czasu.

Dodatkowo, w celu oceny wzrostu uszkodzonego neurytu warto dokonać analizy ekspresji neurotrofin, które wykazują rolę neuroprotektoryjną w procesie regeneracji nerwu. Wyniki badań histologicznych i immunohistochemicznych mogłyby okazać się cenne w celu potwierdzenia powrotu funkcjonalnego uszkodzonej kończyny. Jak wynika z przeglądu literatury, należałoby poddać ocenie ekspresję GFAP (ang. *glial fibrillary acidic protein*), GAP-43, oraz dokonać ana-

lizy ekspresji BDNF w miejscu uszkodzenia nerwu kulszowego, wykorzystując przeciwciała przeciwko powyższym białkom [18-21]. Zaobserwowane w eksperymencie różnice w czasie powrotu funkcji w poszczególnych parametrach mogą odzwierciedlać dynamiczne zmiany równowagi regenerującego nerwu, między innymi poprzez czynniki neurotroficzne, zdolność do przeżycia poszczególnych neuronów, szybkość odrostu poszczególnych aksonów czy następującą mielinizację. Rycina 8 przedstawia przykładową fotografię obrazującą ekspresję BDNF w miejscu uszkodzenia nerwu metodą zmiążdżenia.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, problem regeneracji uszkodzonych nerwów obwodowych jest od dawna przedmiotem intensywnych badań na całym świecie i wciąż aktualnym tematem. Współcześnie coraz częściej dochodzi do uszkodzeń nerwów obwodowych, których rokowanie jest często niekorzystne ze względu na nieskuteczne leczenie. Zrozumienie podstaw związanych z procesem regeneracji jak i pojawiających się zmian w obrębie uszkodzonego neurytu po upływie czasu, pozwoli w przyszłości na opracowanie skutecznych metod leczenia jak i łagodzenia bólu neuropatycznego. Dodatkowo, rozwój w dziedzinie genetyki jak i biologii molekularnej umożliwi poznanie fizjologicznej roli czynników neurotroficznych a to może stanowić obiecującą perspektywę w mechanizmach regeneracji nerwów obwodowych, co z kolei przyczynia się do ich zastosowania w terapii farmakologicznej pacjentów.

PIŚMIENNICTWO

- Huebner EA, Strittmatter SM (2009) Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl Cell Differ* (48): 339-51
- Pigońska J, Bogucki A (2015) Pourazowe uszkodzenia nerwów obwodowych – diagnostyka elektrofizjologiczna. *Family Medicine & Primary Care Review* 4: 334-337
- Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA (2007) The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods* 164(1): 120-30
- Liu X, Duan X (2023) Mechanisms and Treatments of Peripheral Nerve Injury. *Ann Plast Surg* 1;91(2): 313-318
- Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018) BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38(3): 579-593
- Małczyńska P, Piotrowicz Z, Drabarek D, Langfort J, Chalimoniuk M (2019) Rola mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) w procesach neurodegeneracji oraz w mechanizmach neuroregeneracji wywołanej wzmożoną aktywnością fizyczną. *Post Bioch* 65(1): 2-8
- Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gómez-Pinilla F, Twiss JL (2004) Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci* 101(22): 8473-8
- 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
- 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
- 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
- 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

12. 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
13. Kusunoki S (2014) How is the blood-nerve barrier involved in the pathogenetic mechanisms of multifocal motor neuropathy? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85: 473
14. 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
15. 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
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. Białoń N, Suszyński K, Górka M, Trzęsicki M, Górka D, Zając K, Kupczak A (2022) Szlak mTOR i zwierzęta transgeniczne z delecją genu TSC w procesie regeneracji układu nerwowego i wybranych modelach uszkodzeń nerwu kulszowego. *Post Bioch* 69(3): 159-169
18. McGregor CE, English AW (2019) The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Front Cell Neurosci* 11(12): 522
19. Hirata A, Masaki T, Motoyoshi K, Kamakura K (2002) Intrathecal administration of nerve growth factor delays GAP 43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve. *Brain Res* 944(1-2): 146-56
20. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138(2): 155-75
21. Terenghi G (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194: 1-14

Evaluation of the regeneration process of the sciatic nerve of a mouse animal model after application of freezing, crushing or electrocoagulation damage

Dariusz Górka¹, Krzysztof Suszyński¹, Natalia Białoń^{1,2}✉, Mikołaj Górka^{2,3}, Michał Trzęsicki¹, Kacper Zajac¹, Anna Dolińska¹, Filip Tomsia¹

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: natalia.bialon@sum.edu.pl

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

ABSTRACT

The problem of regeneration of damaged peripheral nerves is an ongoing topic and has long been the subject of intensive research worldwide. This study examined the morphological and functional evaluation of the regeneration process within the damaged sciatic nerve, a mouse animal model. The effect of impaired expression of the TSC-1 gene on the process of nerve regeneration was evaluated, depending on the mode of damage. The research object consisted of 48, 2-month-old male TSC lines. The test group consisted of animals that underwent damage to the sciatic nerve by crushing, freezing and electrocoagulation, while the control group includes mice whose sciatic nerve was not damaged. Behavioral tests were conducted to evaluate the functional return of the limb, after 3,5,7 and 14 days. The first changes in the regeneration process of the damaged neurite are observed as early as day 3 after the injury, while on day 14 after the injury the functional return of the damaged limb was noted.

