

FACTORI IMPLICAȚI ÎN REGENERAREA NERVOASĂ DIN SISTEMUL NERVOS PERIFERIC

Conducător științific:

Prof. Dr. **Simona Tache**

Doctorand:

Anne-Marie Chindriș (căs. Constantin)

Cluj-Napoca 2012

CUPRINS

ABREVIERI	12
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Fibrele nervoase	17
1.1. Considerații generale	17
1.1.1. Clasificarea fibrelor nervoase	18
1.1.2. Structura fibrelor nervoase	19
1.1.2.1. Teaca conjunctivă	19
1.1.2.2. Teaca Schwann	19
1.1.2.3. Teaca de mielină	19
1.2. Structura nervilor periferici	20
2. Degenerescenta și regenerarea fibrelor nervoase	21
2.1. Degenerescenta	21
2.1.1. Degenerescenta walleriană	21
2.1.2. Degenerescenta retrogradă	22
2.2. Regenerarea	22
2.2.1. Factori care influențează regenerarea nervilor periferici	23
2.2.1.1. Factori endogeni care stimulează regenerarea nervilor periferici	24
Factori genetici	24
Factori de creștere	26
Factori endogeni antioxidanți	27
2.2.1.2. Factori exogeni care stimulează regenerarea nervilor periferici	28
Factori antioxidanți exogeni	28
Suplimente hormonale	29
Suplimente vitaminice	30
Medicamente neuroprotectoare	30
Factori fizici	31
Materiale utilizate în bioinginerie	32
Efortul fizic	32
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	33
1. Obiective	35
2. Metodologia generală	37
2.1. Tehnica de inducere a leziunii nervoase	37
2.2. Metode fiziologice experimentale	38
2.2.1. Determinarea funcțională originală a indicelui sciatic funcțional	38
2.2.2. Determinarea timpului de latență prin testul algic termic	38
2.3. Determinări biochimice serice	38
2.3.1. Recoltarea probelor biologice	38
2.3.2. Indicatorii biochimici ai balanței O/AO	39
2.4. Analiza histopatologică	40
2.5. Protocolul general	41
2.6. Analiza statistică	41
3. Studiul 1 – Evaluarea funcțională a regenerării nervilor periferici	43
3.1. Introducere	43

3.2. Obiective	44
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	48
3.6. Concluzii	50
4. Studiul 2 – Efectele melatoninei în regenerarea nervului sciatic	51
4.1. Introducere	51
4.2. Obiective	52
4.3. Material și metodă	52
4.4. Rezultate	52
4.5. Discuții	58
4.6. Concluzii	60
5. Studiul 3 – Efectele chitosanului în regenerarea nervului sciatic	61
5.1. Introducere	61
5.2. Obiective	61
5.3. Material și metodă	62
5.4. Rezultate	62
5.5. Discuții	67
5.6. Concluzii	68
6. Studiul 4 – Efectele coenzimei Q10 în regenerarea nervului sciatic	69
6.1. Introducere	69
6.2. Obiective	70
6.3. Material și metodă	70
6.4. Rezultate	71
6.5. Discuții	75
6.6. Concluzii	76
7. Studiul 5 – Efectele atorvastatinei în regenerarea nervului sciatic	77
7.1. Introducere	77
7.2. Obiective	77
7.3. Material și metodă	78
7.4. Rezultate	78
7.5. Discuții	82
7.6. Concluzii	84
8. Studiul 6 – Efectele efortului fizic în regenerarea nervului sciatic	85
8.1. Introducere	85
8.2. Obiective	86
8.3. Material și metodă	86
8.4. Rezultate	87
8.5. Discuții	91
8.6. Concluzii	92
9. Discuții generale.....	93
9.1. Analiza ISF.....	93
9.2. Analiza timpului de latență	94
9.3. Analiza parametrilor biochimici	95
9.4. Corelații între parametrii determinați.....	98
9.5. Analiza histopatologică.....	99
10. Concluzii generale	101
11. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	103
REFERINȚE.....	105

Cuvinte cheie: nerv sciatic, regenerare, melatonină, chitosan, CoQ10, atorvastatină, efort

INTRODUCERE

Atât în viața de zi cu zi, dar mai frecvent la sportivi, pot apare traumatisme care afectează diferiți nervi periferici. Recuperarea morfologică și funcțională a nervilor lezați și factorii care pot accelera aceste procese devin astfel importante pentru activitatea fizică, pentru bunăstarea și calitatea vieții.

Într-o fibră nervoasă lezată, segmentul distal, separat de corpul celular neuronal, suferă un proces de degenerare, iar în cadrul segmentului proximal apare, de asemenea, o degenerare traumatică.

Factorii care stimulează regenerarea fibrelor nervoase periferice sunt de două tipuri, endogeni și exogeni. Printre factorii endogeni se numără factorii genetici și expresia lor, factorii de creștere, factorii antioxidanți endogeni. Administrarea a numeroase substanțe exogene (antioxidanții exogeni,

suplimentele hormonale și vitaminice, medicamentele neuroprotectoare) poate favoriza regenerarea fibrelor nervoase periferice afectate de un traumatism. De asemenea, există factori fizici (câmpuri magnetice, curent electric) implicați în regenerarea nervoasă periferică. Efectele neuroprotectoare și stimulante ale factorilor exogeni pot fi folosite cu succes în practica clinică.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru. Obiective

În încercarea de a stabili o metodă terapeutică eficientă în îmbunătățirea recuperării funcționale a nervului periferic lezat, au fost propuse numeroase preparate și căi de administrare ale acestora. Cercetarea efectuată se bazează pe studii experimentale și are ca scop stabilirea unei metode eficiente de a evalua recuperarea funcțională după lezarea unui nerv periferic și evidențierea rolului unor agenți cu potențial antioxidant, în favorizarea regenerării nervoase.

Obiectivele studiilor experimentale efectuate au fost următoarele:

1. realizarea unui model experimental de leziune nervoasă pe nerv sciatic la șobolan;
2. evaluarea gradului de recuperare funcțională a nervului lezat prin teste adecvate;
3. evaluarea eficienței terapiei antioxidante a unor factori farmacologici și a efortului fizic asupra regenerării fibrelor nervoase;
4. efectuarea unor determinări biochimice pentru aprecierea rolului balanței oxidanți/antioxidanți (O/AO) în cazul leziunilor tisulare nervoase periferice;
5. studiul modificărilor histopatologice induse de factorii regeneratori folosiți, pe preparate obținute după sacrificarea șobolanilor, la încheierea experimentului.

Metodologie generală

Studiile experimentale s-au efectuat în perioada februarie-mai 2012, fiind studii pilot, analitice, longitudinale, prospective, cu durata de 28 de zile. Cercetările s-au desfășurat în cadrul laboratorului de Fiziologie Experimentală, iar determinările biochimice au fost efectuate în Laboratorul pentru Studiul Stresului Oxidativ, din cadrul Disciplinei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”.

S-au utilizat șobolani albi, rasa Wistar, masculi, în vârstă de 16 săptămâni, cu greutatea de 200-300 grame. Loturile de șobolani au fost operate la nivelul membrului posterior drept, la care, după expunerea nervului sciatic, a fost produsă o leziune prin zdrobire a acestuia, pe un segment de 5 mm, la 1-1,2 cm proximal de trifurcație, prin utilizarea unei pense hemostatice menținută timp de 15 secunde.

Indicele sciatic funcțional (ISF), corespunzător analizei funcționale a mersului, a fost calculat pe baza amprentelor plantare, obținute prin eliberarea și deplasarea animalului într-un tunel de sticlă. S-a utilizat o metodă computerizată originală, care constă în fotografierea labei picioarelor posterioare ajutorul Celestron Digital Microscope.

Timpul de latență la stimulul algic termic s-a determinat prin utilizarea plăcii încălzite Ugo Basil 7280, la 53°C. S-a cronometrat timpul de reacție al animalului așezat pe suprafața încălzită, confruntat cu stimulul termic aplicat pe suprafața plantară.

Probele biologice de sânge au fost prelevate din sinusul retroorbital. S-au determinat indicatorii biochimici ai balanței O/AO, pentru stresul oxidativ - malondialdehidă (MDA) și proteinele carbonilate (PC) și pentru apărarea antioxidantă - grupările sulfhidril totale (SH) și glutatationul (GSH).

Pentru examinările histopatologice, probele au fost procesate prin tehnica includerii la parafină și prin tehnica secționării la gheață. Secțiuni longitudinale și transversale din nerv sciatic de la fiecare șobolan, din zona lezionată au fost colorate H&E, respectiv cu Oil Red O și examinate la microscopul optic sau la cel confocal.

Protocol pentru studiile 2-5: la toate loturile (n=10 animale/lot) s-a efectuat lezarea nervului sciatic prin zdrobire la nivelul membrului posterior drept. Studiul a inclus: lotul martor – sedentar, timp de 4 săptămâni după intervenție; lotul I – la care s-a administrat, prin injecție ip, preparatul farmacologic, 4 săptămâni după intervenție. Șobolanii au fost evaluați prin: determinarea ISF în ziua 1 și în ziua 28, la ambele loturi, conform metodei descrise în studiul 1; determinarea timpului de latență la stimulul algic termic la ambele membre posterioare și a parametrilor balanței O/AO; analiza histopatologică a gradului de refacere morfologică indus de factorul regenerator studiat.

Analiza statistică a utilizat testul t-Student pentru eșantioane perechi și independente, analiza de varianță ANOVA-Fisher, testul Post-Hoc cu corecția Scheffe, testul Mann-Whitney pentru o distribuție a datelor negausiană, cu testul Kruskal-Wallis pentru comparațiile între 3 sau mai multe loturi și coeficientul de corelație Pearson. Pentru prezentarea datelor au fost folosite tabele și graficele de tipul box plot.

Studiul 1. Evaluarea funcțională a regenerării nervilor periferici

Pentru stabilirea modelului experimental, s-a efectuat și secționarea și sutura nervului sciatic. S-au utilizat 2 loturi a 15 animale, la care, după lezarea nervului sciatic prin secționare și sutură și, respectiv,

prin zdrobire, șobolanii au fost menținuți în repaus, timp de 28 de zile. S-a evaluat funcțional regenerarea nervoasă periferică, bazată pe determinarea ISF și s-a analizat comparativ evaluarea funcțională în cazul leziunilor prin zdrobirea și prin secționarea nervului (Lot I - T₁ – nerv secționat, 1 săptămână; Lot I - T₂ – nerv secționat, 2 săptămâni; Lot II - T₁ –nerv zdrobit, 1 săptămână; Lot II - T₂ –nerv zdrobit, 2 săptămâni).

Rezultate: aplicarea testului t (Student) perechi indică creșterea semnificativ statistică a valorilor ISF, atât a lotului I - T₂ față de lotul I - T₁ (p=0.000), cât și a lotului II - T₂ față de lotul II - T₁ (p=0.000). De asemenea, s-a observat o corelație semnificativă statistic între valoarea indexului ISF la lotul I - T₁ și valoarea indexului ISF la lotul I - T₂ (r=0.54; p<0.04), respectiv între valoarea indexului ISF la lotul II - T₁ și valoarea indexului ISF la lotul II - T₂ (r=0.991; p<0.000); șobolanii care au avut valori crescute ale ISF la 7 zile, le mențin și la 14 zile. Valorile ISF între tipurile de leziuni la 14 zile prezintă o corelație medie, fapt ce înseamnă că nivelul de regenerare este asemănător, indiferent de tipul de leziune folosit.

Concluzii: 1) Leziunea nervoasă periferică prin zdrobire este urmată de o regenerare mai rapidă, decât cea după secțiunea și sutura termino-terminală a nervului; 2) Pentru evaluarea regenerării nervoase periferice, în leziunile prin zdrobire este recomandat calculul ISF pe baza înregistrării fotografice; 3) Modelul de leziune periferică nervoasă prin zdrobirea nervului sciatic se pretează pentru studiul efectelor imediate a unor factori sau preparate cu rol în regenerare.

Studiul 2. Efectele melatoninei în regenerarea nervului sciatic

S-au administrat ip 0,01 mg/kgc melatonină. S-a utilizat preparatul Mellow Tonin® (Secom). Studiul s-a efectuat conform protocolului descris la metodologie generală.

Rezultate: comparația prin testul t-Student pentru egalitatea mediilor (pe eșantioane perechi) a evidențiat, la sfârșitul tratamentului, o diferență înalt semnificativă statistic între lotul martor și lotul tratat cu melatonină (p=0,000), pentru valoarea ISF; dintre parametrii biochimici doar MDA a avut o evoluție apropiată de limita semnificativității statistice (p=0,085), indicând o scădere a nivelului de SO. Testul Mann-Whitney nu a evidențiat modificări semnificative ale timpului de latență la stimulul algic termic (p=0,6501) la nivelul ambelor membre (posteroare drept, operat și stâng neoperat). Analiza histopatologică a arătat o regenerare foarte bună, cu foarte puține mononucleare care infiltrează nervul sciatic, mielinizare și fibre nervoase de calibru uniform.

Concluzii: 1) Administrarea de melatonină îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice; 2) Valoarea ISF indică o recuperare funcțională bună spre excelentă; 3) Efectul tratamentului cu melatonină asupra timpului de latență la stimulul algic termic este redus; 4) Acțiunea asupra balanței serice O/AO a melatoninei determină în principal scăderea SO, pe baza scăderii MDA; 5) Melatonina determină o regenerare morfologică nervoasă foarte bună; 6) Efectele favorabile asupra regenerării nervoase ale melatoninei se manifestă chiar și în doze mici; 7) Efectele benefice antioxidante ale administrării de melatonină după lezarea prin zdrobire a nervului sciatic, sunt prezente pe toată durata studiată a recuperării nervoase periferice.

Studiul 3. Efectele chitosanului în regenerarea nervului sciatic

S-au administrat ip 1,5 mg/kgc chitosan. S-a utilizat preparatul Chitosan® (Solaray). Studiul s-a efectuat conform protocolului descris la metodologie generală.

Rezultate: comparația prin testul t-Student pentru egalitatea mediilor (pe eșantioane perechi) a evidențiat, la sfârșitul tratamentului, o diferență înalt semnificativă statistic între lotul martor și lotul tratat cu chitosan (p=0,000) pentru valorile ISF și a GSH. Timpul de latență la stimulul algic termic a variat semnificativ statistic la nivelul membrului posterior drept (p=0,0284) (testul Mann-Whitney). Analiza histopatologică a arătat prezența unor zone de edem cu teci de mielină degradate, infiltrat cu numeroase celule mononucleare, puțini axoni vizibili, globule de mielină în celule Schwann și în macrofage.

Concluzii: 1) Administrarea de chitosan îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice; 2) Valoarea ISF indică o recuperare funcțională bună spre medie; 3) Timpul de latență la stimulul algic termic se modifică semnificativ după tratamentul cu chitosan, la nivelul membrului drept, operat; 4) Chitosanul influențează balanța serică O/AO și determină creșterea apărării AO, pe seama creșterii înalt semnificative a GSH; 5) Efectele morfologice asupra regenerării nervoase ale chitosanului sunt reduse.

Studiul 4. Efectele coenzimei Q10 în regenerarea nervului sciatic

S-au administrat ip 0,10 mg/kgc coenzimă Q10. S-a utilizat preparatul Coenzima Q10® (Walmart). Studiul s-a efectuat conform protocolului descris la metodologie generală.

Rezultate: comparația prin testul t-Student pentru egalitatea mediilor (pe eșantioane perechi) a evidențiat, la sfârșitul tratamentului, o diferență înalt semnificativă statistic între lotul martor și lotul tratat cu

CoQ10 ($p=0,000$) pentru valoarea GSH, o corelație semnificativă statistic pentru MDA ($p=0,019$) și ISF ($p=0,013$) și o corelație apropiată de limita semnificativității statistice ($p=0,058$) pentru SH. Timpul de latență la stimulul algic termic a variat semnificativ statistic la nivelul membrului posterior drept ($p=0,0073$) (testul Mann-Whitney). Analiza histopatologică a arătat prezența unor zone cu edem și mielină degradată, fibre nervoase de calibru neuniform, numeroase mononucleare, proliferare de celule Schwann, dispariția focală a axonilor cu prezența mielinei sub formă de globule, o discretă reacție conjunctivă.

Concluzii: 1) Administrarea de CoQ10 îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice; 2) CoQ10 are efecte favorabile asupra recuperării funcționale chiar și în doze mici; 3) ISF indică o recuperare funcțională bună spre medie; 4) Tratamentul cu CoQ10 modifică semnificativ timpul de latență la stimulul algic termic, la nivelul membrului drept, operat; 5) Acțiunea asupra balanței serice O/AO a CoQ10 determină în principal creșterea apărării AO, pe seama SH și GSH și scăderea SO, pe seama MDA; 6) Histopatologic, administrarea de CoQ10 determină o regenerare slabă la nivelul nervului sciatic.

Studiul 5. Efectele atorvastatinei în regenerarea nervului sciatic

S-au administrat ip 0,15 mg/kg atorvastatină. S-a utilizat preparatul Atorvastatin® (Pfizer). Studiul s-a efectuat conform protocolului descris la metodologie generală.

Rezultate: comparația prin testul t-Student pentru egalitatea mediilor (pe eșantioane perechi) a evidențiat, la sfârșitul tratamentului, o diferență înalt semnificativă statistic între lotul martor și lotul tratat cu atorvastatină ($p=0,000$), pentru valoarea ISF și o diferență semnificativă statistic pentru valorile MDA ($p=0,005$), SH ($p=0,033$) și GSH ($p=0,012$). Timpul de latență la stimulul algic termic a variat semnificativ statistic la nivelul membrului posterior drept, operat ($p=0,0452$) (testul Mann-Whitney). Analiza histopatologică a arătat o regenerare mai avansată, puține zone cu edem sau mielină degradată, foarte rare mononucleare, calibru uniform al fibrelor nervoase, teacă de mielină uniformă cu prezența axonilor în interior.

Concluzii: 1) Administrarea de atorvastatină îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice; 2) Atorvastatina are efecte favorabile asupra recuperării funcționale chiar și în doze mici; 3) ISF indică o recuperare funcțională medie; 4) Tratamentul cu atorvastatină modifică semnificativ timpul de latență la stimulul algic termic, la nivelul membrului drept, operat; 5) Acțiunea atorvastatinei asupra balanței serice O/AO determină în principal scăderea SO și creșterea apărării AO; 6) Administrarea de atorvastatină determină o regenerare morfologică foarte bună.

Studiul 6. Efectele efortului fizic în regenerarea nervului sciatic

La toate loturile s-a efectuat lezarea nervului sciatic prin zdrobire la nivelul membrului posterior drept. Studiul a inclus: lotul martor – sedentar, timp de 4 săptămâni după intervenție; lotul I – antrenat la efort. Deoarece modificările degenerative ating nivelul maxim la două săptămâni, după care încep să regreseze, lotul testat la efort a început antrenamentul din ziua 15, pe o durată de 14 zile (ziua 15-28). Proba de înot s-a desfășurat într-un bazin cu dimensiunile de 100 cm lungime/50 cm lățime/60 cm înălțime, cu temperatura apei menținută la 22°C și nivelul apei la 30 cm înălțime. Șobolani au fost antrenați pe parcursul a 1 oră, în 6 sesiuni a câte 5 min/sesiune, cu 5 min pauză între ele. După intervenție, șobolani au fost evaluați prin: determinarea ISF în ziua 1 și în ziua 28, la ambele loturi, conform metodei descrise în studiul 1; determinarea timpului de latență la stimulul algic termic la ambele membre posterioare și a parametrilor balanței O/AO; analiza histopatologică a gradului de refacere morfologică indus de efortul fizic.

Rezultate: comparația prin testul t-Student pentru egalitatea mediilor (pe eșantioane perechi) a evidențiat, la sfârșitul antrenamentului, o diferență aproape de limita semnificativității statistice ($p=0,053$) pentru valoarea ISF. Parametrii biochimici nu s-au modificat semnificativ statistic la lotul antrenat la efort. Testul Mann-Whitney nu a evidențiat modificări semnificative ale timpului de latență la stimulul algic termic. Analiza histopatologică a arătat prezența unor zone de edem sau mielină degradată, numeroase celule mononucleare, proliferare de celule Schwann, rare fibroblaste și celule perineuriale, creșterea cantității de mielină și debris lipidic în interiorul fibrelor nervoase, calibru neuniform al fibrelor nervoase, uneori cu dispariția axonilor, o discretă reacție reparatorie fibroasă.

Concluzii: 1) Antrenamentul fizic îmbunătățește recuperarea funcției motorii la debutul procesului de regenerare, după o leziune nervoasă periferică; 2) ISF indică o recuperare funcțională bună spre medie; 3) Antrenamentul efectuat nu modifică semnificativ timpul de latență la stimulul algic termic; 4) Un exercițiu fizic de înot pe durata a 2 săptămâni nu modifică semnificativ balanța serică O/AO; 5) Antrenamentul efectuat nu stimulează refacerea morfologică a leziunii nervoase; 6) Efectele benefice ale unui antrenament de înot de 14 zile, după zdrobirea nervului, sunt prezente în faza tardivă a recuperării nervoase periferice; 7) Exercițiul fizic reprezintă o intervenție kinetoterapeutică, cu aplicare indicată din faza de debut a regenerării nervoase periferice, împreună cu alte mijloace terapeutice.

Concluzii generale

1. Funcțional, se constată pe baza creșterii indicelui sciatic funcțional, o recuperare motorie după leziunea nervoasă periferică pentru toate loturile testate, mai exprimată după administrarea de melatonină, chitosan, dar prezentă și după tratamentul cu coenzimă Q10, atorvastatină și antrenamentul la efort.

2. Biochimic, diminuarea stresului oxidativ, pe seama scăderii malon-dialdehidei, s-a obținut după administrarea de coenzimă Q10 și atorvastatină, iar creșterea apărării antioxidante, exprimată prin refacerea rezervei de glutatation și grupări sulfhidril, s-a realizat după administrarea de coenzimă Q10, atorvastatină și chitosan.

3. Scăderea stresului algeziec, prin reducerea timpului de latență la testul algic termic, a însoțit scăderea stresului oxidativ după administrarea de coenzimă Q10, chitosan și atorvastatină.

4. Histopatologic, cea mai bună capacitate de refacere a nervului periferic lezat a fost evidențiată după administrarea de melatonină și atorvastatină; efectele morfologice ale administrării de chitosan și CoQ10 în regenerarea nervului periferic au fost mai reduse.

5. Factorii antioxidanți utilizați au efecte favorabile în regenerarea fibrelor nervoase periferice lezate, cele mai bune efecte funcționale, biochimice și morfologice au fost obținute după administrarea de melatonină și CoQ10.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Originalitatea lucrării constă în: cercetarea metodologică complexă, unitară, din punct de vedere histopatologic, funcțional și biochimic a leziunii nervului sciatic; utilizarea unui model original pentru studiul funcțional (indicele sciatic funcțional, timpul de latență algeziec), care s-a dovedit a fi funcțional și a permis obținerea de rezultate comparabile cu ale altor cercetători; studierea modificărilor homeostaziei redox în leziunile nervoase periferice sub influența unor agenți farmacologici neuroprotectori și cu proprietăți antioxidante (melatonină, chitosanul, coenzima Q10, atorvastatină), precum și sub influența efortului fizic moderat, ca factor antioxidant.

Contribuțiile inovatoare sunt următoarele:

- chitosanul a fost administrat ca atare ip, nu sub formă de derivați, ceea ce constituie o metodă nouă de administrare. Rezultatele obținute au fost promițătoare, chiar la administrarea în doză mai mică.

- CoQ10 a fost studiată pe modele de boli degenerative ale SNC, în doze mult mai mari (peste 1000 x) și nu am găsit date experimentale despre efectul CoQ10 asupra regenerării nervoase periferice. Rezultatele obținute au fost foarte bune, chiar și la doza mică administrată.

- rezultatele experimentale au aplicabilitate clinică și recomandă ca tratamentul chirurgical în cazul traumatismelor nervoase periferice să fie asociat cu administrarea unor preparate neuroprotectoare, ca strategie de regenerare și plasticitate nervoasă, în recuperarea postleziunală. Aceasta deschide noi perspective spre elaborarea unor scheme terapeutice eficiente, facile, care să poată fi aplicate în mod curent, astfel încât să beneficieze o categorie largă de pacienți.

Bibliografie selectivă

1. Raica M, Mederle O, Căruntu ID, Pinteș A, Chindriș A-M. Histologie teoretică și practică. Ed. Brumar, Timișoara, 2004; 57-73

2. Tache S. Investigarea funcțiilor sistemului nervos. Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1995; 3:33-60

3. Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2011; 12: 364-366, 369, 375-377, 386-389.

4. Constantin AM, Tache S. Stimulating factors for the regeneration of peripheral nerves. Clujul Medical - Journal of Medicine and Pharmacy, 2012; 1 (85): 12-19

5. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. Prog Neurobiol. 2012;98(1):16-37.

6. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. Neuroimmunomodulation. 2010; 17(5):314-324.

7. Șovrea A, Chindriș AM, Damian A. Aspecte morfo-funcționale ale celulelor Schwann. Revista română de anatomie funcțională și clinică, macro- și microscopică și de antropologie. Editura „Gr. T. Popa” Iași, 2008; VII (3): 369-374.

8. Yang DP, Kim J, Syed N, et al. p38 MAPK activation promotes denervated Schwann cell phenotype and functions as a negative regulator of Schwann cell differentiation and myelination. J Neurosci. 2012;32(21):7158-7168.

9. Pinteș A, Ignitiadis I, Crișan D, Toader-Radu M, Miha C, Chindriș AM, Melincovici C. Aspecte histologice privind regenerarea nervoasă prin manșon epineural, la 6 săptămâni postoperator, nota I. Revista Universității de Medicină și Farmacie, Ed. Medicală Universitară Craiova, 2003; 238-242.

10. Pîntea A, Ignitiadis I, Crișan D, Toader-Radu M, Miha C, Chindriș AM, Melincovici C. Aspecte histologice privind regenerarea nervoasă prin manșon epineural, la 12 săptămâni postoperator, nota II. *Analele Societății Naționale de Biologie Celulară*, Editura Risoprint, Cluj-Napoca, 2003;461-464.
11. Shakhbazov A, Martinez JA, Xu QG, et al. Evidence for a systemic regulation of neuro-trophin synthesis in response to peripheral nerve injury. *J Neurochem*. 2012;122(3):501-511.
12. Scholz T, Rogers JM, Krichevsky A, et al. Inducible nerve growth factor delivery for peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 126(6):1874-1889.
13. Kumar A, Meena S, Kalonia H, et al. Effect of nitric oxide in protective effect of melatonin against chronic constriction sciatic nerve injury induced neuropathic pain in rats. *Indian J Exp Biol*. 2011; 49(9):664-671.
14. Zencirci SG, Bilgin MD, Yaraneri H. Electrophysiological and theoretical analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *J Neurosci Methods*. 2010; 191(2):277-282.
15. Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, et al. Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model. *Glia*. 2010; 58(8):954-963.
16. Lee TH, Pan H, Kim IS, et al. Functional regeneration of severed peripheral nerve using an implantable electrical stimulator. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010; 2010:1511-1514.
17. Rochkind S, Geuna S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:445-464.
18. Cho Y, Shi R, Borgens RB. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury. *J. of Experim. Biol.*, 2010; 213: 1513-1520
19. Yuan Y, Zhang P, Yang Y, et al. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*, 2004; 25: 4273-4278.
20. Tache S. Stresul oxidativ. Efectele benefice ale speciilor reactive ale oxigenului. În Dejica D (sub red.). *Stresul oxidativ în bolile interne*. Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000, 50-68, 85-88
21. Byun YH, Lee MH, Kim SS, et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(2):222-228.
22. Udina E, Cobiañchi S, Allodi I, Navarro X. Effects of activity-dependent strategies on regeneration and plasticity after peripheral nerve injuries. *Ann Anat*. 2011; 193(4):347-353.
23. Constantin AM, Gligor D, Tache S, Moldovan R. Evaluarea funcțională a regenerării nervilor periferici în leziuni ale nervului sciatic la șobolan. *Clujul Medical*, 2012; 2 (85): 194-199.
24. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 1982; 77: 634-643
25. Gligor D. Sutura termino-laterală a nervilor periferici. Teză de Doctorat. UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2009; 51-55
26. van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997; 78:70-77
27. Turgut M, Kaplan S. Effects of melatonin on peripheral nerve regeneration. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2011; 5(2):100-108.
28. Zencirci SG, Bilgin MD, Yaraneri H. Electrophysiological and theoretical analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *J Neurosci Methods*., 2010; 191(2):277-282.
29. Constantin AM, Login C, Bondor C, et al. Efectele melatoninei și chitosanului în regenerarea nervului sciatic zdrobit la șobolan. *Clujul Medical*, 2012; 2 (85): 363-368.
30. Dumitru Rareș Ciocoi-Pop. Influența CoQ10 asupra capacității de efort fizic. Teză de Doctorat. UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2009
31. Ayaz M, Tuncer S, Okudan N, Gokbel H. Coenzyme Q(10) and alpha-lipoic acid supplementation in diabetic rats: conduction velocity distributions. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008; 30(5):367-374.
32. Daglioglu E, Berker M, Demirci M, et al. Microscopic and electrophysiological changes on regenerating sciatic nerves of rats treated with simvastatin. *Folia Neuropathol*. 2010;48(1):49-56.
33. Udina E, Puigdemasa A, Navarro X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. *Muscle Nerve*. 2011; 43(4):500-509.
34. Chindriș AM, Crăciun DD, Leuca V. Leziuni nervoase și articulare la nivelul umărului în sport. *Palestrica mileniului III - Civilizație și sport*, 2007; VIII(2):88-92.
35. Constantin AM, Login C, Bondor C, et al. The effects of exercise on rat sciatic nerve regeneration. *Palestrica of the third millennium - Civilization and sport*, 2012; 13(2): 130-134.
36. Teodori RM, Betini J, de Oliveira LS, et al. Swimming exercise in the acute or late phase after sciatic nerve crush accelerates nerve regeneration. *Neural Plast*, 2011; 2011: 783901

Abstract of the doctoral thesis

Factors involved in the nerve regeneration of the peripheral nervous system

Scientific coordinator: Prof. Dr. Simona Tache

Doctoral candidate: Anne-Marie Chindriș (married Constantin)

Cluj-Napoca 2012

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. The nerve fibers	17
1.1. General considerations	17
1.1.1. Classification of nerve fibers	18
1.1.2. Structure of nerve fibers	19
1.1.2.1. Connective sheath	19
1.1.2.2. Schwann sheath	19
1.1.2.3. Myelin sheath	19
1.2. Structure of the peripheral nerve	20
2. Degeneration and regeneration of nerve fibers	21
2.1. The degeneration	21
2.1.1. Wallerian degeneration	21
2.1.2. Retrograde degeneration	22
2.2. The regeneration	22
2.2.1. Factors influencing peripheral nerve regeneration	23
2.2.1.1. Endogenous factors that stimulate peripheral nerve regeneration	24
Genetic factors	24
Growth Factors	26
Endogenous antioxidants factors	27
2.2.1.2. Exogenous factors that stimulate peripheral nerve regeneration	28
Exogenous antioxidants factors	28
Hormonal supplements	29
Vitamin supplements	30
Neuroprotective drugs	30
Physical factors	31
Materials used in bioengineering	32
Exercise	32
PERSONAL CONTRIBUTION	33
1. Objectives	35
2. General Methodology	37
2.1. The technique used to induce nerve injury	37
2.2. Experimental physiological methods	38
2.2.1. The original functional determination of sciatic functional index	38
2.2.2. Determination of latency time by painful heat test	38
2.3. Serum biochemistry	38
2.3.1. Biological sampling	38

2.3.2. Biochemical indicators of the O/AO balance	39
2.4. Histopathological analysis	40
2.5. General Protocol	41
2.6. Statistical analysis	41
3. Study 1 - Functional evaluation of peripheral nerve regeneration	43
3.1. Introduction	43
3.2. Objectives	44
3.3. Materials and methods	44
3.4. Results	46
3.5. Discussions	48
3.6. Conclusions	50
4. Study 2 - Effects of melatonin in sciatic nerve regeneration	51
4.1. Introduction	51
4.2. Objectives	52
4.3. Materials and methods	52
4.4. Results	52
4.5. Discussions	58
4.6. Conclusions	60
5. Study 3 - Effects of chitosan in sciatic nerve regeneration	61
5.1. Introduction	61
5.2. Objectives	61
5.3. Materials and methods	62
5.4. Results	62
5.5. Discussions	67
5.6. Conclusions	68
6. Study 4 - Effects of coenzyme Q10 in sciatic nerve regeneration	69
6.1. Introduction	69
6.2. Objectives	70
6.3. Materials and methods	70
6.4. Results	71
6.5. Discussions	75
6.6. Conclusions	76
7. Study 5 - Effects of atorvastatin in sciatic nerve regeneration	77
7.1. Introduction	77
7.2. Objectives	77
7.3. Materials and methods	78
7.4. Results	78
7.5. Discussions	82
7.6. Conclusions	84
8. Study 6 - Effects of exercise in sciatic nerve regeneration	85
8.1. Introduction	85
8.2. Objectives	86
8.3. Materials and methods	86
8.4. Results	87
8.5. Discussions	91
8.6. Conclusions	92
9. General Discussion	93
9.1. SFI Analysis	93
9.2. Analysis of the latency time	94
9.3. Biochemical analysis	95
9.4. Correlations between determined parameters	98
9.5. Histopathological analysis	99
10. General conclusions	101
11. Originality and innovative contributions of the thesis	103
REFERENCES	105

Keywords: sciatic nerve regeneration, melatonin, chitosan, CoQ10, atorvastatin, exercise.

INTRODUCTION

Both in everyday life, but more frequently in athletes, there can happen injuries which may be affecting different peripheral nerves. The morphological and functional recovery of the injured nerves and the factors that can accelerate these processes become important for physical activity and for the welfare and quality of life.

In an injured nerve fiber, the distal segment, separated from neuronal cell body, undergoes Wallerian degeneration and the proximal segment suffers also a traumatic degeneration.

The factors that stimulate regeneration of peripheral nerve fibers are of two types, endogenous and exogenous. Endogenous factors include the genetic factors and their expression, the growth factors, the endogenous antioxidants factors. The exogenous administration of various substances (exogenous antioxidants, hormonal and vitamin supplements, neuroprotective drugs) may promote the regeneration of the peripheral nerve fibers affected by trauma. There are also physical factors (magnetic fields, electricity) involved in the peripheral nerve regeneration. The neuroprotective and stimulants effects of the exogenous factors can be successfully used in clinical practice.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis. Objectives

In an attempt to establish an effective therapeutic approach to improve the functional recovery of an injured peripheral nerve, numerous preparations and their routes of administration have been proposed. This research is based on experimental studies and aims to establish an efficient method to evaluate the functional recovery after a peripheral nerve injury and to highlight the potential role of some antioxidant agents in promoting the nerve regeneration.

The objectives of the experimental studies were:

1. to establish an experimental model of the nerve injury in the rat sciatic nerve;
2. to evaluate the degree of functional recovery of injured nerve by appropriate tests;
3. to assess the antioxidant therapy efficiency of some pharmacological factors and exercise in the regeneration of nerve fibers;
4. to perform biochemical measurements in order to assess the role of oxidant/antioxidant (O/AO) balance in case of peripheral nerve tissue damage;
5. to study the histopathological changes induced by the regenerative factors used, on preparations obtained after sacrificing the rats at the end of the experiment.

General Methodology

Experimental studies were conducted from February to May 2012, and were pilot studies analytical, longitudinal, prospective, lasting 28 days. The research was conducted in the laboratory of Experimental Physiology and the biochemical determinations were performed in the Laboratory for the Study of Oxidative Stress, in the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu".

We used white rats, Wistar, male, aged 16 weeks, weighing 200-300 grams. The groups of rats were operated on right posterior limb; after the exposure of sciatic nerve, was produced an injury by crushing the nerve, in a segment of 5 mm, at 1-1.2 cm proximal to trifurcation, using a haemostatic clamp maintained for 15 seconds.

The sciatic functional index (SFI), corresponding to the functional gait analysis, was calculated based on plant fingerprints obtained by releasing and moving the animal inside a glass tunnel. An original computerised method was used, which consists of shooting the hind paw using Celestron Digital Microscope.

The latency time to painful heat stimulus was determined using the heated plate Ugo Basil 7280, at 53° C. We registered the animal's reaction time on the heated plate, confronted to the thermal stimulus applied to the plantar surface.

The biological samples of blood were taken from the retrobulbar sinus. We determined the biochemical indicators of the oxidant/antioxidant (O/AO) balance, for the oxidative stress (OS) - malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins (CP) and for the antioxidant defense (AD) - total sulfhydryl groups (SH) and glutathione (GSH).

For the histopathological examinations, the samples were processed by paraffin inclusion technique and by sectioning on ice technique. Longitudinal and transverse sections of sciatic nerve from each rat, from the lesion site, were stained H&E and Oil Red O and examined under the optical and confocal microscope.

The general protocol for studies 2-5 was: in all groups (n = 10 animals/group) was performed sciatic nerve injury, by crushing, at right posterior limb level. The study included: the control group - sedentary for 4 weeks after surgery, the group I - who received, by ip injection, the pharmacological preparation, 4 weeks after surgery. Rats were evaluated by determination of: SFI - on day 1 and day 28 in both groups, as described in study 1; latency time to painful heat stimulus - to both posterior limbs; parameters of the O/AO balance and by the histopathological analysis of the morphological recovery degree induced by the preparation studied.

The statistical analysis used the Student t-test for paired and independent samples, the analysis of variance ANOVA-Fisher, the post-hoc test with Scheffe correction, the Mann-Whitney test for data with non-Gaussian distribution, the Kruskal-Wallis test for comparisons between 3 or several groups and the Pearson correlation coefficient. For displaying data were used tables and graphs such as box plot.

Study 1. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration

In order to establish the experimental model, a sciatic nerve sectioning and suturing was performed also. We used 2 groups of 15 animals, in which, after the sciatic nerve injury by sectioning and suturing, respectively, by crushing, the rats were kept at rest for 28 days. We assess functionally the peripheral nerve regeneration, based on SFI determination and analyzed comparatively the functional assessment for crushing and nerve sectioning injuries (group I - T1 - nerve cut, 1 week; group I - T2 - nerve cut, 2 weeks; group II - T1 nerve crushed, 1 week; group II - T2 - nerve crushed, 2 weeks).

Results: the t-test (Student) pairs showed statistically significant increases of SFI values, both in group I - T2 compared to group I - T1 (p=0.000) and in the group II - T2 compared to group II - T1 (p=0.000). Also, there was a statistically significant correlation between the SFI index value in group I - T1 and SFI index value in group I - T2 (r=0.54, p<0.04), respectively between SFI index value in group II - T1 and SFI index value in group II - T2 (r=0.991, p<0.000); the rats which had elevated SFI values at 7 days, maintain them also at 14 days. The SFI values between the types of lesions at 14 days displayed an average correlation, which means that the regeneration level is similar, regardless of the type of lesion used.

Conclusions: 1) The peripheral nerve injury by crushing is followed by a faster recovery than the one by sectioning and end-to-end nerve suture, 2) In order to assess the peripheral nerve regeneration in crush injuries is recommended the SFI calculation based on photographic recording; 3) The model of peripheral nerve injury by crushing the sciatic nerve is suitable for studying the immediate effects of factors and preparations involved in regeneration.

Study 2. Melatonin effects in sciatic nerve regeneration

We administered ip 0.01 mg/kg melatonin. We used the preparation Mellow Tonin ® (SECOM). The study was performed according to the protocol described in the general methodology.

Results: the comparison by Student t-test for the equality of means (on sample pairs) found, at the end of treatment, a statistically highly significant difference between the control group and the group treated with melatonin (p=0.000) for SFI value; between the biochemical parameters, only MDA has fared close to the limit of statistical significance (p=0.085), indicating a decrease in the SO level. Mann-Whitney test showed no significant change in latency time to painful heat stimulus (p=0.6501) in both limbs (posteriors right, operated and left, unoperated). Histopathological analysis showed a very good regeneration, with very few mononuclear cells infiltrating the sciatic nerve, myelination and uniform diameter of nerve fibers.

Conclusions: 1) The administration of melatonin improves the recovery of motor function in peripheral nerve injuries, 2) The SFI value indicates a good to excellent functional recovery, 3) The melatonin treatment effect on latency time to painful heat stimulus is reduced, 4) The melatonin action on serum O/AO balance determined mainly a decrease of OS, based on MDA decrease; 5) The melatonin produce a very good morphological nerve regeneration; 6) The favorable effects of melatonin on nerve regeneration occurs even in small doses; 7) The beneficial antioxidant effects dues to melatonin administration, after sciatic nerve crushing injury, are present throughout the whole studied period of peripheral nerve recovery.

Study 3. Effects of chitosan in sciatic nerve regeneration

We administered ip 1.5 mg / kg chitosan. We used the preparation Chitosan ® (Solaray). The study was performed according to the protocol described in the general methodology.

Results: the comparison by Student t-test for the equality of means (on sample pairs) found, at the end of treatment, a statistically highly significant difference between the control group and the group treated with chitosan ($p=0.000$) for the SFI and GSH values. The latency time to painful heat stimulus varied significantly statistic at the level level of posterior right limb ($p=0.0284$) (Mann-Whitney test). The histopathological analysis showed the presence of edema areas with degraded myelin sheaths, infiltrated with numerous mononuclear cells, few visible axons, the myelin globules inside Schwann cells and macrophages.

Conclusions: 1) The use of chitosan improves the recovery of motor function in peripheral nerve injuries, 2) The SFI value indicates a good to average functional recovery, 3) The latency time to painful heat stimulus changes significantly after treatment with chitosan, at the level of operated right limb, 4) The chitosan influences the serum O/AO balance and produces an increase of AD, due to a highly significant increase of GSH; 5) The morphological effects of chitosan in nerve regeneration are reduced.

Study 4. Effects of coenzyme Q10 in sciatic nerve regeneration

We administered ip 0.10 mg / kg coenzyme Q10. We used the preparation Coenzyme Q10 ® (Walmart). The study was performed according to the protocol described in the general methodology.

Results: the comparison by Student t-test for the equality of means (on sample pairs) found, at the end of treatment, a statistically highly significant difference between the control group and the group treated with CoQ10 ($p = 0.000$) for GSH value, a statistically significant correlation for MDA ($p=0.019$) and SFI ($p=0.013$) values and a correlation close to statistical significance limit ($p=0.058$) for SH value. The latency time to painful heat stimulus varied significantly statistic at the level of posterior right limb ($p=0.0073$) (Mann-Whitney test). The histopathological analysis showed the presence of some areas with edema and degraded myelin, uneven-caliber nerve fibers, numerous mononuclear cells, proliferation of Schwann cells, focal disappearance of axons with presence of myelin globules, a discrete connective tissue reaction.

Conclusions: 1) The administration of CoQ10 improves the recovery of motor function in peripheral nerve injuries, 2) CoQ10 has favorable effects on functional recovery even in small doses, 3) SFI indicates a good to average functional recovery, 4) The treatment with CoQ10 significantly modify the latency time to painful heat stimulus, at the level of operated right limb, 5) The CoQ10 action on the O/AO serum balance determines mainly an increase of AD, on account of SH and GSH and a decrease of SO, on behalf of MDA, 6) Histopathologically, the administration of CoQ10 results in poor regeneration of sciatic nerve.

Study 5. Effects of atorvastatin in sciatic nerve regeneration

We administered ip 0.15 mg/kg atorvastatin. We used the preparation Atorvastatin ® (Pfizer). The study was performed according to the protocol described in the general methodology.

Results: the comparison by Student t-test for the equality of means (on sample pairs) found, at the end of treatment, a statistically highly significant difference between the control group and the group treated with atorvastatin ($p=0.000$) for SFI value, a statistically significant difference for the MDA ($p=0.005$), SH ($p=0.033$) and GSH ($p=0.012$) values. The latency time to painful heat stimulus varied statistically significant at the level of posterior right limb, operated ($p=0.0452$) (Mann-Whitney test). The

histopathological analysis showed a more advanced regeneration, few areas with edema or degraded myelin, very rare mononuclear cells, uniform caliber nerve fibers, uniform myelin sheath consistent with the presence of axons within.

Conclusions: 1) The administration of atorvastatin improves the recovery of motor function in peripheral nerve injuries, 2) Atorvastatin has favorable effects on functional recovery even in small doses, 3) SFI value indicates an average functional recovery, 4) The treatment with atorvastatin significantly modify the latency time to painful heat stimulus, at the level of operated right limb, 5) The atorvastatin action on O/AO serum balance determines mainly a decrease of OS and an increase of AD, 6) The administration of atorvastatin causes a very good morphological regeneration.

Study 6. Effects of exercise in sciatic nerve regeneration

In all groups was performed the sciatic nerve damage by crushing the nerve at the right rear limb. The study included: the control group - sedentary for 4 weeks after surgery, the group I - trained to swimming exercise. Because the degenerative changes touch the peak level at two weeks, after that starting to regress, the exercise tested group began training at 15th day after surgery, for a period of 14 days (day 15-28). The swimming test was conducted in a 100 cm length/50 cm width/60 cm height swimming pool, water temperature maintained at 22°C and the water level at 30 cm height. The rats were trained over 1 hour, in 6 sessions of 5 min/session, 5 min break between. After surgery, rats were evaluated by determination of: SFI - on day 1 and day 28 in both groups, as described in study 1; latency time to painful heat stimulus - to both rear limbs; serum parameters of the O/AO balance; histopathological analysis of the degree of exercise-induced morphological recovery.

Results: the comparison by Student t-test for the equality of means (on sample pairs) found, at the end of training, a difference close to the statistical significance level ($p=0.053$) for the SFI value. The biochemical parameters were not significantly altered in the exercise trained group. The Mann-Whitney test showed no significant changes in latency time to painful heat stimulus. The histopathological analysis showed the presence of areas with edema and degraded myelin, numerous mononuclear cells, proliferation of Schwann cells, rare fibroblasts and perineurial cells, increased myelin quantities and lipid debris inside nerve fibers, uneven caliber of nerve fibers, sometimes with loss of axons, a discrete fibrous reparative response.

Conclusions: 1) The physical training improves motor function recovery at the onset of regeneration process, after a peripheral nerve injury, 2) SFI indicates a good to average functional recovery, 3) The conducted training does not significantly alter the latency time to the thermal painful stimulus; 4) A swimming exercise during the two weeks did not significantly alter the balance of serum O/AO, 5) The conducted training does not stimulate the morphological recovery of nerve lesion; 6) The beneficial effects of a 14 days swimming training, after nerve crush, are present in the late phase of peripheral nerve recovery; 7) The exercise represent a kinetotherapeutical intervention, with application indicated from the first phase of peripheral nerve regeneration, together with other therapeutic means.

General conclusions

1. Functionally, based on the sciatic functional index increase, it is present a motor recovery after the peripheral nerve injury for all groups tested, more expressed after the administration of melatonin, chitosan, but also present after the treatment with coenzyme Q10, atorvastatin and training exercise.

2. Biochemically, the decrease of the oxidative stress, based on the decrease of malondialdehyde, was obtained after the administration of coenzyme Q10 and atorvastatin, and the increase of antioxidant defense, expressed by the restoring of glutathione reserves and sulfhydryl groups, was obtained after the administration of coenzyme Q10, atorvastatin and chitosan.

3. The decrease of algic stress, by reduction of latency time to thermal pain test, accompanied the decrease in oxidative stress after the administration of coenzyme Q10, chitosan and atorvastatin.

4. Histopathologically, the best ability of recovering an injured peripheral nerve was evidenced after the administration of melatonin and atorvastatin; the morphological effects of chitosan and CoQ10 administration in peripheral nerve regeneration were lower.

5. The used antioxidants factors have beneficial effects in injured peripheral nerve fibers regeneration, the best functional, biochemical and morphological effects were obtained after administration of melatonin and CoQ10.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality of this work consists in: a complex, unitary methodological research of the sciatic nerve lesion, in terms of histological, functional and biochemical notions; the use of an original model for the functional study (sciatic functional index, pain latency time), which proved to be functional and allowed us to obtain comparable results with other researchers; the study of changes in redox homeostasis in peripheral nerve lesions under the influence of neuroprotective pharmacological agents with antioxidant properties (melatonin, chitosan, coenzyme Q10, atorvastatin) and also under the influence of moderate exercise as a antioxidant factor.

Innovative contributions are as follows:

- chitosan was administered ip as such, not derivative, which is a new method of administration. The results were promising, even at lower dose administration.

- CoQ10 has been studied in models of CNS degenerative diseases, in doses much higher (1000 x) and I have not found experimental data on the effect of CoQ10 on peripheral nerve regeneration. The results were very good, even at the low dose administered.

- these experimental results have clinical applicability and recommend the surgical treatment to be associated with the use of neuroprotective drugs, in case of peripheral nerve injuries, as a better strategy to insure nerve regeneration and plasticity, in postlesional recovery. This opens new perspectives for the development of effective therapeutic regimens, easy, which can be applied routinely in order to benefit a wide range of patients.

Selected references

1. Raica M, Meder O Căruntu ID, Pinteă A, Chindriș AM. Theoretical and practical histology. Ed Brumar, Timișoara, 2004, 57-73
2. Tache S. Investigation nervous system functions. Dacia Publishing House, Cluj-Napoca, 1995, 3:33-60
3. Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2011, 12: 364-366, 369, 375-377, 386-389.
4. Constantin AM, Tache S. Factors stimulating the regeneration of peripheral nerves for. Applied Medical - Journal of Medicine and Pharmacy, 2012, 1 (85): 12-19
5. Allodi I, Udine E, Navarro X. Peripheral nerve regeneration of Specificity: Interactions at the axon level. Prog Neurobiol. 2012, 98 (1) :16-37.
6. Cámara-Lemarroy CR, Guzman-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. Neuroimmunomodulation. 2010, 17 (5) :314-324.
7. Șovrea A, Chindriș AM, Damian A. Morpho-functional aspects of Schwann cells. Romanian Journal of Functional and clinical anatomy, macro-and microscopic and anthropology. Publishing "Gr T. Popa "Iași, 2008, VII (3): 369-374.
8. Yang DP, Kim J, Syed N, et al. p38 MAPK activation promotes denervated Schwann cell phenotype and functions as a negative regulator of Schwann cell differentiation and myelination. J Neurosci. 2012, 32 (21) :7158-7168.
9. Pinteă A, Ignitiadis I, Crisan D, Toader, Radu M, Mișu C, Chindriș AM, Melincovici C. Histological aspects of nerve regeneration through epineural sleeve at 6 weeks postoperatively, note I. Review University of Medicine and Pharmacy, Medical Publishing Craiova University, 2003, 238-242.
10. Pinteă A, Ignitiadis I, Crisan D, Toader, Radu M, Mișu C, Chindriș AM, Melincovici C. Histological aspects of nerve regeneration through epineural sleeve at 12 weeks postoperatively, grade II. Annals of the National Society of Cell Biology, Ed Risoprint, Cluj-Napoca, 2003, 461-464.
11. Shakhbazov A, Martinez JA, Xu QG, et al. Evidence for the systemic regulation of neuro-trophin synthesis in response to peripheral nerve injury. J Neurochem. 2012, 122 (3) :501-511.

12. Scholz T, Rogers JM, Krichevsky A, et al. Inducible nerve growth factor for peripheral nerve regeneration delivery in vivo. *Plast Surg rebuild*. 2010, 126 (6) :1874-1889.
13. Kumar A, Meena S, Kalona H, et al. Effect of nitric oxide in protective effect of melatonin against chronic constriction sciatic nerve injury induced neuropathic pain in rats. *Indian J Exp Biol*. 2011, 49 (9) :664-671.
14. Zencirci SG, Bilgin MD, Yaraneri H. Electrophysiological and Theoretical Analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *J Neurosci Methods*. 2010, 191 (2) :277-282.
15. Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, et al. Endogenous glucocorticoids Improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model. *Glia*. 2010, 58 (8) :954-963.
16. Lee TH, Pan H, Kim IS, et al. Functional Regeneration of Severed Peripheral nerve using implantable electrical stimulator year. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010, 2010:1511-1514.
17. Rochkind S, Geun S, Shainberg A. Chapter 25: Phototherapy in peripheral nerve injury: effects on muscle preservation and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009, 87:445-464.
18. Cho Y, Shi R, Borgens RB. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological Following traumatic spinal cord injury recovery. *J. of exper. Biol.*, 2010, 213: 1513-1520
19. Yuan Y, Zhang P, Yang Y, et al. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and Fibers in vitro. *Biomaterials*, 2004, 25: 4273-4278.
20. Tache S. Oxidative stress. The beneficial effects of reactive oxygen species. In Dejica D (in red.). *Oxidative stress in internal diseases*. Book Publishing House of Science, Cluj-Napoca, 2000, 50-68, 85-88
21. Byun YH, Lee MH, Kim SS, et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression Following sciatic nerve injury in rats crushed. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005, 45 (2) :222-228.
22. Udine E, Cobianchi S, Allodi I, Navarro X. Effects of activity-dependent plasticity and regeneration strategies on peripheral nerve injuries after. *Ann Anat*. 2011, 193 (4) :347-353.
23. Constantin AM, Gligor D, Tache S, Moldovan R. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Applied Medical Informatics*, 2012, 2 (85): 194-199.
24. The Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 1982, 77: 634-643
25. Gligor D. Termino-lateral suture of peripheral nerves. PhD thesis. "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, 2009, 51-55
26. van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, et al. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med rehabilitated*, 1997, 78:70-77
27. Turgut M, Kaplan S. Effects of melatonin on peripheral nerve regeneration. *Pat Endocr Metab Immune Drug recent DISCOV*. 2011, 5 (2) :100-108.
28. Zencirci SG, Bilgin MD, Yaraneri H. Electrophysiological and Theoretical Analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *J Neurosci Methods*., 2010, 191 (2) :277-282.
29. Constantin MA, Login C, Bondor C, et al. Effects of melatonin and chitosan in crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Applied Medical Informatics*, 2012, 2 (85): 363-368.
30. Ciocoi-Pop DR. Influence of CoQ10 on exercise capacity. PhD thesis. "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, 2009
31. Ayaz M, Tuncer S, Okudan N Gokbel H. Coenzyme Q (10) and alpha-lipoic acid supplementation in diabetic rats: conduction velocity distributions. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008, 30 (5) :367-374.
32. Daglioglu E, Berker M, Demirci M, et al. Microscopic and electrophysiological changes on regenerating sciatic nerves of rats Treated with simvastatin. *Folia Neuropathol*. 2010, 48 (1) :49-56.
33. Udine E Puigdemasa A, Navarro X. Passive and active regeneration and muscle reinnervation Improve exercise after peripheral nerve injury in the rat. *Muscle Nerve*. 2011, 43 (4) :500-509.
34. Chindriș AM, Crăciun DD, Leuca V. Nerve and joint injuries to the shoulder in sports. *Palestrica Millennium III - Civilization and Sport*, 2007, VIII (2) :88-92.
35. Constantin AM, Login C, Bondor C, et al. The effects of exercise on rat sciatic nerve regeneration. *Palestrica of the third millennium - Civilization and Sport*, 2012, 13 (2): 130-134.
36. Teodori RM, Betina J, de Oliveira LS, et al. Swimming in the acute exercise or after sciatic nerve crush late phase accelerates nerve regeneration. *Neural Plast*, 2011, 2011: 783,901