

EFECTELE MELATONINEI ȘI CHITOSANULUI ÎN REGENERAREA NERVULUI SCIATIC ZDROBIT LA ȘOBOLAN

ANNE-MARIE CONSTANTIN, CEZAR LOGIN, COSMINA BONDOR, SIMONA TACHE, REMUS MOLDOVAN

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Rezumat

Premize. Efectele protective celulare și antioxidant benefice al melatoninei și chitosanului, prin limitarea distrugerilor moleculare, ar putea stimula regenerarea nervilor periferici lezați și ar putea avea acțiune neuroprotectoare.

Obiective. Ne-am propus să studiem influența melatoninei și chitosanului asupra recuperării funcționale neuromotorii, prin măsurarea indicelui sciatic funcțional (ISF) la șobolani cu leziuni ale nervului periferic.

Material și metode. Nervul sciatic a fost lezat acut prin zdrobire la 3 loturi de șobolani Wistar albi, masculi (n=10 animale/lot). Timp de 28 de zile, la lotul I s-au administrat 0,01 mg/kgc melatonină, iar la lotul II s-au administrat 1,5 mg/kgc chitosan. S-a determinat ISF la toate loturile, în zilele 1 și 28.

Rezultate. În perioada de recuperare, administrarea de melatonină și chitosan îmbunătățește semnificativ recuperarea funcțională. ISF a fost semnificativ mai bun la lotul tratat cu melatonină decât la lotul tratat cu chitosan.

Concluzii. 1) Administrarea de melatonină și chitosan îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice. 2) Melatonina are efecte favorabile asupra regenerării nervoase chiar și în doze mici. 3) Efectele benefice antioxidante ale administrării de melatonină după lezarea prin zdrobire a nervului sciatic, pot persista pe toată durata recuperării nervoase periferice.

Cuvinte cheie: melatonină, chitosan, nerv sciatic, regenerare.

EFFECTS OF MELATONIN AND CHITOSAN IN THE REGENERATION OF RAT CRUSHED SCIATIC NERVE

Abstract

Background. The beneficial cellular protective and antioxidative effects of melatonin and chitosan, by limiting the molecular destruction, could stimulate the peripheral nerve regeneration and exert a neuroprotective action.

Aims. In this study we proposed to investigate the influence of melatonin and chitosan on the functional neuromotor recovery, by measuring the sciatic functional index (SFI) in rats with peripheral nerve injuries.

Material and methods. The sciatic nerve was acutely injured by crush lesion in 3 groups of white Wistar rats, male (n=10 animals/group). The experimental groups were: control group, group I – treated with 0,01 mg/kgc melatonin (day 1-28); group II – treated with 1,5 mg/kgc chitosan (day 1-28). SFI was determined in all groups in days 1 and 28.

Results. During the recovery period, administration of melatonin and chitosan improved significantly the functional recovery. SFI was significantly better in melatonin treated group than in chitosan treated group.

Conclusions. 1) Administration of melatonin and chitosan improves motor function in peripheral nerve lesion recovery. 2) Melatonin has favorable effects

on nerve regeneration even in low-doses. 3) The beneficial antioxidative effects of melatonin treatment after sciatic nerve crush injury could persist for the whole time length of peripheral nerve recovery.

Keywords: melatonin, chitosan, sciatic nerve, regeneration.

INTRODUCERE

Înteruperea continuității axonale (axonotmeza) fără secționarea structurilor tecale, ca rezultat al leziunii prin zdrobire a nervului periferic sciatic, determină deficite ale sensibilității, deficite motorii și dizabilități funcționale [1]. Segmentul proximal al axonului degenerază în apropierea leziunii pe o scurtă distanță, afectând doar unul sau câteva segmente internodale (degenerare retrogradă sau traumatică), dar își menține continuitatea cu centrul trofic din corpul celular neuronal (perikarion) și ulterior regenerează. Segmentul distal, separat de perikarion suferă un proces de degenerare anterogradă sau Walleriană. În segmentul de nerv distal de leziune, axonul și mielina, dar nu și țesutul conjunctiv, degenerază complet și sunt fagocitate și îndepărtate de macrofage. Înteruperea barierei nerv-sânge permite influxul din vasele de sânge de macrofage derivate din monocite. Procesul de îndepărtare a mielinei este de obicei completat în 2 săptămâni [2].

Creșterea fibrei nervoase începe odată ce resturile sunt îndepărtate de macrofage. Macrofagele produc citokine care stimulează secreția de neurotrofine din celulele Schwann. Celulele Schwann proliferază în interiorul manșonului de țesut conjunctiv și formează benzi celulare, care servesc ca ghid pentru mugurii axonali formați în faza reparativă. Un mugure axonal asociat cu o bandă celulară va crește de-a lungul acesteia cu aproximativ 3 mm/zi [2,3]. Deși mulți muguri noi nu iau contact cu benzile celulare și degenerază, numărul lor mare crește probabilitatea de restabilire a conexiunilor neuronale senzitive și motorii.

Timpul este de asemenea important. O denervare cu durată scurtă nu afectează regenerarea mugurilor colaterali, dar o denervare prelungită reduce profund mugurii colaterali regenerați în segmentul nervos distal [4].

Regenerarea este eficientă funcțional doar atunci când fibrele și coloanele de celule Schwann sunt direcționate în locul corect. Într-un nerv mixt lezat, dacă fibrele senzitive care se regenerează cresc în interiorul unor coloane conectate la plăcile motorii terminale care au fost ocupate de fibre motorii, funcția mușchiului nu va fi restabilită.

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) este un hormon indolaminic lipofilic, derivat din triptofan și secretat de glanda pineală și de retină. Se caracterizează prin fotosensibilitate, ritmicitate diurnă sau circadiană. Este sintetizat în cantități crescute în cursul nopții, față de zi, la

toate vertebraele. Scăderea activității a fost observată în funcție de vârstă [5].

Melatonina acționează ca hormon, în mod primar, asupra unor receptori de membrană [6] sau intracelular, ca epurator de radicali liberi [7]. Are proprietăți lipofile foarte ridicate și străbate membranele cu ușurință. Rolul determinant protector al melatoninei în stresul oxidativ poate fi primar, direct (ca epurator direct al radicalului hidroxil) și secundar, indirect, prin efectul stimulator asupra secreției și activității glutation-peroxidazei, catalazei și superoxidismutazei și prin efectul inhibitor al lipoperoxidării și al nitricoxid sintetazei [8].

Melatonina străbate bariera sânge-nerv și pătrunde ușor în celulă și ajunge în compartimentele subcelulare și la nivelul nucleului și penetrează în nucleu. Acționează ca un stabilizator al membranelor, mărindu-le rezistența la stresul oxidativ indus de diverși factori (ischemie-reperfuze, depleția de glutation etc.). Se concentrează preferențial în nucleu și are rol protector asupra modificărilor ADN induse de radiații ionizante și radicali liberi [9,10] și previne efectul inhibitor la nivelul mitocondriilor. Activitatea antioxidantă maximă a melatoninei apare la concentrații de 150-200 $\mu\text{mol/l}$ [5,11].

Chitosanul, un biopolimer natural încărcat pozitiv, este format prin N-deacetilarea chitinei. Chitina este al doilea cel mai abundent polizaharid natural și este obținută în principal din exoscheletele a numeroase crustacee. Chitosanul se direcționează preferențial în țesuturile lezate și acționează ca un supresor al generării speciilor reactive de oxigen (SRO) și al peroxidării lipidelor membranare, așa cum apare în prelevări ex vivo de măduvă spinală [12].

Datorită excelentei biocompatibilități, biodegradabilități și toxicității scăzute, chitosanul a fost investigat extensiv ca biomaterial potențial într-o largă varietate de aplicații, care include transportor de medicamente, agent de vindecare a rănilor, aditiv de surfactant pulmonar, eșafodaj pentru ingineria tisulară [13,14,15,16]. În particular, chitosanul este capabil să formeze agregate fosfolipidice mari, prin inducerea fuziunii bistraturilor de dipalmitoil fosfatidilcolină, care sunt un component major al membranei plasmactice [16,17].

Chitosanul este capabil să reducă producerea de specii reactive de oxigen mediată de leziune și să restricționeze peroxidarea lipidică prin restaurarea membranei plasmactice și să permită recuperarea conducerii impulsului nervos [12].

Lezarea acută a membranei celulare intacte ca răspuns la forțe mecanice (zdrobirea nervului) conduce la deteriorarea funcției de barieră a membranei și necroză tisulară [18,19,20]. Un proces lezional prelungit, persistent

Articol intrat la redacție în data de: 04.06.2012

Primit sub formă revizuită în data de: 14.06.2012

Acceptat în data de: 20.06.2012

Adresa pentru corespondență: annemarie_chindris@yahoo.com

și progresiv, se produce secundar la nivel celular datorită afectării membranei celulare, prin apariția de SRO, care determină peroxidarea lipidică a lamelei interne a membranei celulare și producerea de toxine endogene puternice (acroleina), care vor determina moartea celulei [21,22].

Studii *in vivo* și *in vitro* arată că polimeri hidrosolubili neionici pot induce o sigilare rapidă (minute) a membranei permeabilizate, restaurează conducerea impulsurilor nervoase și produce o recuperare a funcției pe modele de leziuni ale măduvei spinării și cerebrale [23,24,25].

IPOTEZĂ

Efectele protective celulare și antioxidant benefice al melatoninei și chitosanului, prin limitarea distrugerilor moleculare, ar putea stimula regenerarea nervilor periferici lezați și ar putea avea acțiune neuroprotectoare.

MATERIAL ȘI METODE

Sudiul este de tip experimental, longitudinal, prospectiv, efectuat pe animale. Cercetarea s-a desfășurat în cadrul Departamentului de Fiziologie al UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, în Laboratorul de Fiziologie Experimentală, pe 3 loturi (n = 10 animale/lot) de șobolani Wistar albi, masculi, în vârstă de 16 săptămâni, cu greutatea medie de 200-300 g. Animalele au fost menținute în condiții de vivarium adecvate, hrană și apă ad libitum, cu respectarea condițiilor etice.

a) Loturi

La toate loturile s-a efectuat lezarea nervului sciatic prin zdrobire. Loturile au fost grupate astfel:

- lotul martor – 4 săptămâni sedentar după intervenție;
- lotul I – la care s-au administrat prin injecție i.p. 0,01 mg/kgc melatonină, 4 săptămâni după intervenție (Z1-Z28);
- lotul II – la care s-au administrat prin injecție i.p. 1,5 mg/kgc chitosan, 4 săptămâni după intervenție (Z1-Z28).

b) Metode

Șobolanii au fost aneșteziați intramuscular cu soluție ketamină 0,13 ml/100 g (2/3 Ketamină 5% și 1/3 Xylazină 2%). Câmpul operator a fost aseptizat, animalele au fost

cântărite și marcate și membrul posterior drept a fost pregătit pentru procedura chirurgicală. După expunerea nervului sciatic, s-a indus o leziune acută prin zdrobirea unui segment de 5 mm la 1-1,2 cm proximal de trifurcația nervului, utilizând o pensă hemostatică pentru 15 secunde.

După intervenție, șobolanii au fost evaluați prin determinarea ISF în ziua 1 postoperator (momentul T₁) și în ziua 28 (momentul T₂), la toate cele 3 loturi.

ISF, corespunzător analizei funcționale a mersului, a fost calculat utilizând imaginile obținute prin fotografierea șobolanilor în interiorul unui tunel de sticlă (8,2 x 42 cm). Am utilizat formula de mai jos, modificată de Bain și colab. [26]:

$$SFI = -38.3 \times \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \times \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \times \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

Rezultatele au fost interpretate utilizând următoarele valori (tabelul I):

Tabelul I. Valorile calitative ale recuperării funcționale în funcție de ISF [27].

Nivelul SFI	Recuperare funcțională
12 până la -12	Excelentă
-13 până la -37	Bună
-38 până la -62	Medie
-63 până la -87	Nesatisfăcătoare
-88 până la -137	Deficit complet

c) Prelucrarea statistică a datelor

Rezultatele obținute în urma studiului experimental au fost organizate într-o bază de date și prelucrate statistic folosindu-se programele SPSS 13.0 și MedCalc 11.0.

Pentru aprecierea normalității distribuției rezultatelor au fost utilizate testele Kologorov-Smirnov și Shapiro-Wilk. Analiza statistică descriptivă a urmărit indicii de centralitate (medie și mediană), indicatorii dispersiei rezultatelor: abaterea standard, valoarea minimă și valoarea maximă.

În cazul în care distribuția datelor a fost una negaussiană, am folosit teste neparametrice. Testul Mann-Whitney apreciază semnificația diferențelor dintre ranguri pentru două loturi diferite. Comparațiile între 3 sau mai multe loturi au fost efectuate folosindu-se testul Kruskal-Wallis.

Pentru parametrii evaluați în dinamică, s-a analizat semnificația diferențelor dintre ariile de sub curbă folosin-

Tabelul II. Valorile ISF la loturile studiate.

Lot		Lot martor (control)		Lot I (melatonină)		Lot II (chitosan)	
Parametru		T1	T2	T1	T2	T1	T2
Mean		-63,03221	-34,51610	-59,43676	-17,72641	-55,81213	-29,57574
Std. Error		2,136661	1,541294	2,349533	1,287284	2,145668	,986471
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-67,86567	-38,00275	-64,75177	-20,63845	-60,66597	-31,80729
	Upper Bound	-58,19875	-31,02945	-54,12175	-14,81437	-50,95829	-27,34419
Median		-62,01825	-32,12375	-56,14400	-16,49395	-52,70875	-30,40600
Std. Deviation		6,756715	4,874000	7,429876	4,070749	6,785197	3,119494
Minimum		-73,793	-45,055	-71,607	-25,155	-67,438	-32,915
Maximum		-51,341	-30,855	-50,754	-13,853	-49,692	-23,049

du-se testul t Student (pentru date parametrice) și testele Mann-Whitney și Kruskal-Wallis pentru cele neparametrice. Am considerat semnificative rezultatele obținute la un $p \leq 0,05$.

REZULTATE

Valorile statistice descriptive pentru cele trei loturi studiate sunt următoarele (tabelul II):

Testul Kruskal-Wallis a arătat că între cele 3 loturi nu există o diferență semnificativă statistic p (Asymp. Sig.) $> 0,05$ (0,060) la momentul T1, dar aceasta apare pentru momentul T2, p (Asymp. Sig.) $< 0,05$ (0,000) (tabelul III).

Tabelul III. Comparație între valorile ISF la cele 3 loturi.

Test Moment	Test Statistics ^{a,b}		
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
T1	5,628	2	,060
T2	21,399	2	,000

Test Statistics^{a,b}: a. Kruskal Wallis Test, b. Grouping Variable: Goup

Comparația prin testul Mann-Whitney a evidențiat o diferență semnificativă statistic între: lotul martor și lotul tratat cu chitosan, $p < 0,05$ (0,016); lotul martor și lotul tratat cu melatonină, $p < 0,05$ (0,000); lotul tratat cu chitosan și lotul tratat cu melatonină $p < 0,05$ (0,000) (tabelul IV).

Cea mai bună recuperare funcțională (dreapta cea mai abruptă, valorile negative cele mai mici) a avut-o lotul tratat cu melatonină (-17,72 – recuperare funcțională bună, aproape de valoarea la limită cu -13 = excelentă), față de lotul tratat cu chitosan (-31,80: – recuperare funcțională bună, aproape de valoarea la limită cu -37 = medie) (Fig. 1).

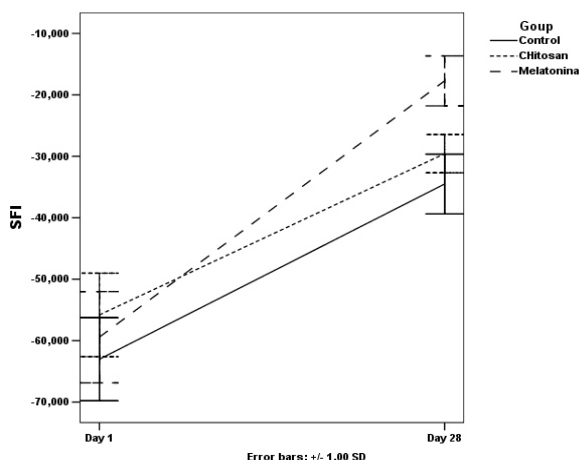


Fig. 1. Evoluția valorilor ISF la cele 3 loturi.

Tabelul IV. Comparații ale valorilor ISF între loturi.

Comparație	Test Statistics ^b				
	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]
Martor - Chitosan	18,000	73,000	-2,419	,016	,015 ^a
Martor - Melatonină	,000	55,000	-3,780	,000	,000 ^a
Chitosan - Melatonină	2,000	57,000	-3,628	,000	,000 ^a

Test Statistics^b: a. Not corrected for ties, b. Grouping Variable: Goup.

DISCUȚII

Pe un model experimental de pinealectomie, s-a arătat că **melatonina** joacă un rol în morfologia țesutului nervos periferic, modificările morfometrice putând fi un indicator al caracteristicii neuroprotective a melatoninei [28]. În studii de microscopie electronică și biochimice asupra modificărilor organitelor celulare, mielinei și axonilor în leziunea nervului periferic, s-a observat că melatonina induce o protecție structurală semnificativă a lamelor de mielină, degenerarea axonală și modificările mielinei au fost mai puțin proeminente histopatologic la lotul tratat cu melatonină. Efectul neuroprotectiv s-a confirmat și biochimic, prin valori semnificativ scăzute ale peroxidării lipidice și activității mieloperoxidazice [29]. Datele obținute indică, de asemenea, că melatonina are efecte protective puternice și prin prevenirea supraexpresiei mediatorilor proinflamatorii și inhibiția efectelor mai multor citokine proinflamatorii [30]. Tratamentul cu melatonină reduce nivelele ridicate de citokine proinflamatorii, factorul de necroză tumorală α (TNF- α) și interleukina-6 (IL-6), nitric oxid sintetaza inductibilă (NOSi) și ciclooxigenaza COX-2 la nivelul nervului sciatic lezat [31].

Efectul morfologic favorabil asupra regenerării fibrei nervoase se exercită și indirect, prin influențarea formării de collagen. Formarea unei cicatrice de collagen la capătul secționat al unui nerv împiedică înmugurirea axonală și limitează procesul de regenerare. La animalele pinealectomizate s-a observat o expresie puternică a factorului de creștere și transformare $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și factorului de creștere fibroblastic bazic (bFGF) la nivelul tecii epineuriale. Această modificare sugerează că TGF- $\beta 1$ și bFGF au un rol important în controlul acumulării de collagen și formării neuromului și că melatonina are un efect benefic asupra regenerării nervului [32].

Acțiunea neuroprotectivă, alături de cele de chelare de radicali liberi, antioxidante, analgezice, sugerează un posibil efect asupra bolilor degenerative ale nervilor periferici. În prezent, este larg acceptat că melatonina are un efect favorabil asupra lungimii și înmuguririi axonale, după evenimente traumatice ale nervilor periferici [33].

Efectele benefice antioxidante și protective celulare ale melatoninei în leziunea nervoasă periferică pot persista o perioadă mai îndelungată, modificări favorabile electrofiziologice și funcționale fiind observate și la 12 săptămâni [34].

Comparând doza și durata de administrare față de cele efectuate de alți autori, rezultatele obținute de noi sunt concordante cu datele din literatură asupra efectului

favorabil, chiar ale unui tratament cu doze foarte mici (0,01 mg/kg, față de 5 și 20 mg/kg), pe o durată similară de timp (28 de zile, față de 21), cu aceeași modalitate de administrare intraperitoneală [35]. Și alte studii au confirmat influența dozei asupra efectului favorabil al melatoninei. Deși tratamentul cu doze mici reduce fragmentarea mielinei și modificările axonale induse de traumă, administrarea melatoninei în doze mari (50 mg/kg) poate neutraliza aproape complet modificările ultrastructurale [36].

Aceste rezultate sugerează că aplicarea melatoninei este o strategie promițătoare pentru tratamentul leziunilor nervoase periferice.

Chitosanul a fost studiat în principal prin aplicații externe, în ingineria biomaterialelor ca eșafodaj, pentru tuburi impregnate cu diverse substanțe sau celule stem (de exemplu celule stem mezenchimale derivate din măduvă), care să refacă legătura în fibra nervoasă secționată și să favorizeze regenerarea nervoasă [37] sau în nanomedicină pentru sintetizarea de nanosfere, care să elibereze topic (cerebral) peptide active biologic [38].

Aplicarea topică de chitosan după o secționare completă sau o compresie a măduvei spinării la porci de guinea facilitează sigilarea membranelor neuronale în testele *ex vivo* și restaurează conducerea impulsurilor nervoase de-a lungul măduvei spinării *in vivo* [5].

Atât chitosanul, cât și chitoooligozaharidele (COZ) derivate, prezintă numeroase efecte biologice, cum ar fi cele antibacteriene, antioxidante, de inhibare a metaloproteinazelor matriciale, antidiabetice, anti-HIV, antiinflamatorii [39].

Pe modele *in vitro* de boli neurologice (boala Alzheimer) s-a arătat că chitosanul hidrosolubil cu greutate moleculară mare inhibă producția de citokine proinflamatorii, TNF- α și IL-6 [40] și este capabil să protejeze împotriva apoptozei [41].

La ora actuală, majoritatea efectelor neuroprotective ale chitosanului și a derivatelor sale au fost observate *in vitro*. Sunt necesare studii ulterioare care să investigheze activitatea acestora pe modele de șoareci și/sau subiecți umani. Rezultatele obținute până acum relevă potențialul chitosanului și al derivatelor sale ca și candidați terapeutici posibili în tulburările neurodegenerative [39].

În studiul nostru am obținut un efect favorabil asupra regenerării nervoase periferice a chitosanului, de intensitate mai mică decât efectul melatoninei (ISF = -31,80: - recuperare funcțională bună, aproape de valoarea la limită cu -37 = medie). Un studiu similar a urmărit efectul COZ administrate zilnic pe aceeași cale intraperitoneală, pe o durată apropiată de 3 săptămâni (4 săptămâni în studiul nostru), în doze de 3 și 6 mg/kg (1,5 mg/kg în studiul nostru), observând de asemenea un efect de promovare a regenerării nervoase periferice [42]. Un alt studiu (doze de 1,5 și 3 mg/kg, administrare 6 săptămâni) a evidențiat neuroafinitatea și/sau acțiunile neuroprotective ale COZ (numărul fibrelor nervoase mielinice, grosimea tecii de mielină

regenerate au fost semnificativ îmbunătățite) [43].

Mai sunt însă necesare studii ulterioare pe modele experimentale la animale pentru introducerea testelor clinice umane.

CONCLUZII

1) Administrarea de melatonină și chitosan îmbunătățește funcția motorie în recuperarea unei leziuni nervoase periferice.

2) Melatonina are efecte favorabile asupra regenerării nervoase chiar și în doze mici.

3) Efectele benefice antioxidante ale administrării de melatonină după lezarea prin zdrobire a nervului sciatic, pot persista pe toată durata recuperării nervoase periferice.

Bibliografie

1. van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, Gispens WH. 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
2. 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
3. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology. Text and atlas*. 12th edition. McGraw-Hill Companies, Inc, 2010; 9: 140, 158-161, 163-166.
4. Kou Y, Zhang P, Yin X, et al. Influence of different distal nerve degeneration period on peripheral nerve collateral sprouts regeneration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2011; 39(4):223-227.
5. 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.
6. Spadoni G, Stankov B, Duranti A, et al. 2-Substituted 5-methoxy-N-acyltryptamines: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, and evaluation of the biological activity. *J Med Chem*. 1993;36(25):4069-74.
7. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 1993; 26: 1141-1155
8. Reiter RJ. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect.*, 1998; 11(5):291-296.
9. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF. Cyclic-3-hydroxymelatonin: a melatonin generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals & Recept.*, 1999; 8(1-2): 70-74.
10. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res*. 1993;15(2):59-69.
11. Sewerynek E, Poeggeler B, Melchiorri D, Reiter RJ. H₂O₂-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neurosci Lett*. 1995; 195(3):203-205.
12. 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
13. Gan Q, Wang T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carriersystematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf. B, Biointerfaces*, 2007; 59: 24-34.

14. Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control Release*, 2001; 73: 255-267.
15. Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X, Gu X. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*, 2004; 25: 4273-4278.
16. Zuo YY, Alolabi H, Shafiei A, et al. Chitosan enhances the in vitro surface activity of dilute lung surfactant preparations and resists albumin-induced inactivation. *Pediatr. Res.*, 2006; 60: 125-130.
17. Pavinatto FJ, Pavinatto A, Caseli L, et al. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. *Biomacromolecules*, 2007; 8: 1633-1640.
18. Borgens RB. Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons. *Adv. Neurol*, 1988; 47: 51-66.
19. Borgens RB. Cellular engineering: molecular repair of membranes to rescue cells of the damaged nervous system. *Neurosurgery*, 2001; 49: 370-378.
20. Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, Trojanowski JQ, Moroi J. Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1997; 56: 347-359.
21. Luo J, Shi R. Acrolein induces axolemmal disruption, oxidative stress, and mitochondrial impairment in spinal cord tissue. *Neurochem. Int.* 2004; 44: 475-486.
22. Luo J, Shi R. Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem. Int.* 2005; 46: 243-252.
23. Koob AO, Borgens RB. Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces beta-amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83: 1558-1563.
24. Koob AO, Duerstock BS, Babbs CF, Sun Y, Borgens RB. Intravenous polyethylene glycol inhibits the loss of cerebral cells after brain injury. *J. Neurotrauma*, 2005; 22: 1092-1111.
25. Laverty PH, Leskova A, Breur GJ, et al. A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. *J. Neurotrauma*, 2004; 21: 1767-1777.
26. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 1989; 83: 129-138.
27. Gligor D. Sutura termino-laterală a nervilor periferici. Teză de Doctorat. UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 2009; 51-55.
28. Turgut M, Kaplan S, Unal BZ, et al. Stereological analysis of sciatic nerve in chickens following neonatal pinealectomy: an experimental study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2010;5:10.
29. Daglioglu E, Serdar Dike M, Kilinc K, et al. Neuroprotective effect of melatonin on experimental peripheral nerve injury: an electron microscopic and biochemical study. *Cent Eur Neurosurg.* 2009;70(3):109-114.
30. Ochoa JJ, Diaz-Castro J, Kajarabille N, et al. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. *J Pineal Res.* 2011; 51(4):373-380.
31. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res.*, 2011; 50(2):124-131.
32. Turgut M, Oktem G, Uysal A, Yurtseven ME. Immunohistochemical profile of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor in sciatic nerve anastomosis following pinealectomy and exogenous melatonin administration in rats. *J Clin Neurosci.* 2006; 13(7):753-758.
33. Turgut M, Kaplan S. Effects of melatonin on peripheral nerve regeneration. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011; 5(2):100-108.
34. Atik B, Erkutlu I, Tercan M, Buyukhatipoglu H, Bekerecioglu M, Pence S. The effects of exogenous melatonin on peripheral nerve regeneration and collagen formation in rats. *J Surg Res.* 2011; 166(2):330-336.
35. 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.
36. Shokouhi G, Tubbs RS, Shoja MM, et al. Neuroprotective effects of high-dose vs low-dose melatonin after blunt sciatic nerve injury. *Childs Nerv Syst.* 2008; 24(1):111-117.
37. Zheng L, Cui HF. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 Jun 3. R
38. Karatas H, Aktas Y, Gursay-Ozdemir Y, et al. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci.* 2009; 29(44):13761-13769.
39. Pangestuti R, Kim SK. Neuroprotective properties of chitosan and its derivatives. *Mar Drugs.* 2010; 8(7):2117-2128.
40. Kim MS, Sung MJ, Seo SB, Yoo SJ, Lim WK, Kim HM. Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid [beta] peptide and interleukin-1[beta]. *Neurosci. Lett.* 2002; 321: 105-109.
41. Koo, H.N.; Jeong, H.J.; Hong, S.H.; Choi, J.H.; An, N.H.; Kim, H.M. High molecular weight water-soluble chitosan protects against apoptosis induced by serum starvation in human astrocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13: 245-249.
42. Jiang M, Zhuge X, Yang Y, Gu X, Ding F. The promotion of peripheral nerve regeneration by chitooligosaccharides in the rat nerve crush injury model. *Neurosci Lett.* 2009; 454(3):239-243.
43. Gong Y, Gong L, Gu X, Ding F. Chitooligosaccharides promote peripheral nerve regeneration in a rabbit common peroneal nerve crush injury model. *Microsurgery.* 2009; 29(8):650-656.