
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

MOLECULE IMPLICATE ÎN NEUROPROTECȚIE ȘI NEUROREGENERARE

Doctorand **Nadina-Liana Pop**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Remus Orăsan**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Leziunile nervoase periferice: aspecte generale	21
1.1. Leziunile nervoase periferice	21
1.1.1. Definiție, localizare, cauze, clasificare, fiziopatologie	21
1.1.1.1. Definiție	21
1.1.1.2. Localizare	21
1.1.1.3. Cauze	22
1.1.1.4. Clasificare	22
1.1.1.5. Fiziopatologie	22
2. Reabilitarea în leziunile nervoase periferice	25
2.1. Obiective principale în reabilitarea leziunilor nervoase periferice	25
2.2. Metode de reabilitare în leziunile nervoase periferice	25
2.2.1. Kinetoterapia	25
2.2.2. Stimularea electrică nervoasă transcutanată (TENS)	27
2.2.3. Ultrasunetul	28
2.2.4. Laserterapia de joasă frecvență (biostimularea laser)	28
2.2.5. Terapia cu unde de șoc extracorporale de joasă frecvență (ESWT)	30
2.2.6. Psihoterapia și recuperarea psihologică	30
2.3. Terapia farmacologică în leziunile nervoase periferice	31
2.3.1. Durerea neuropată asociată leziunilor nervoase periferice	31
2.3.2. Terapia farmacologică cu antiinflamatoare nonsteroidiene	31
2.3.3. Terapia farmacologică cu agenți neurotrofici din grupul vitaminelor B	31
2.3.4. Terapia farmacologică cu alți agenți medicamentoși	32
2.3.5. Terapia farmacologică a durerii asociate leziunilor nervoase periferice -tendințe actuale	32
3. Nanomedicina și leziunile nervoase periferice	33
3.1. Considerente generale privind utilizarea nanomedicinii și nanoparticulelor	33
3.2. Nanoparticulele în tratamentul leziunilor nervoase periferice	33
3.2.1. Noțiuni generale privind utilizarea nanoparticulelor în tratamentul leziunilor nervoase periferice	33
3.2.2. Nanoparticulele cu chitosan în tratamentul leziunilor nervoase periferice	34

3.2.3. Toxicitatea nanoparticulelor cu chitosan	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologia generală	39
2.1. Caracteristicile animalelor utilizate și durata cercetării experimentale	40
2.2. Inducerea leziunii nervoase periferice	40
2.3. Administrarea tratamentului	41
2.4. Monitorizarea tratamentului prin evaluarea indicelui funcțional sciatic (SFI)	41
2.5. Monitorizarea tratamentului prin evaluarea comportamentului animalelor asociat prezenței durerii (analgesiometrie)	42
2.6. Monitorizarea tratamentului prin studii histologice, de microscopie cu transmisie electronică (TEM) și spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX – Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy)	42
2.7. Monitorizarea tratamentului prin analiza evoluției în dinamică a greutateii corporale a animalelor	43
2.8. Monitorizarea tratamentului prin analiza evoluției în dinamică a nivelurilor serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6)	44
2.9. Analiza statistică a parametrilor studiați	44
3. Studiul 1 – Evaluarea eficienței nanoparticulelor magnetice din oxid de fier funcționalizate cu chitosan în regenerarea nervoasă periferică	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.3.1. Nanoparticulele magnetice funcționalizate cu chitosan: preparare și caracterizare	51
3.3.2. Leziunea nervoasă periferică: distribuirea animalelor pe loturi, inducerea leziunii nervoase periferice, administrarea și monitorizarea tratamentului	52
3.3.3. Analiza statistică a parametrilor studiați	52
3.4. Rezultate	52
3.4.1. Caracterizarea nanoparticulelor magnetice și a nanoparticulelor magnetice cu chitosan prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	53
3.4.2. Caracterizarea nanoparticulelor magnetice și a nanoparticulelor magnetice cu chitosan prin microscopie cu transmisie electronică și magnetometrie	55
3.4.3. Evaluarea eficienței tratamentului prin analiza indicelui funcțional sciatic (SFI)	
3.4.4. Evaluarea eficienței tratamentului prin analiza comportamentului animalelor asociat durerii (analgesiometrie)	61
3.4.5. Evaluarea eficienței tratamentului prin analiza evoluției în dinamică a greutateii corporale a animalelor	63
	64

3.4.6. Evaluarea eficienței tratamentului prin analiza studiilor histologice, de microscopie cu transmisie electronică (TEM) și spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX)	67
3.4.7. Evaluarea eficienței tratamentului prin analiza evoluției în dinamică a valorilor serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6)	
3.5. Discuții	68
3.6. Concluzii	71
4. Studiul 2 - Evaluarea eficienței tratamentului oral cu chitosan în recuperarea leziunilor nervoase periferice	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	75
4.3. Material și metodă	75
4.3.1. Chitosan: obținere, preparare, administrare	75
4.3.1.1. Obținere și preparare	75
4.3.1.2. Administrare	75
4.3.2. Leziunea nervoasă periferică: distribuția animalelor pe loturi, inducerea leziunii nervoase periferice, evaluarea tratamentului cu chitosan	75
4.3.3. Analiza statistică a parametrilor studiați	76
4.4. Rezultate	76
4.4.1. Eficiența tratamentului prin raportare la evoluția în dinamică a indicelui funcțional sciatic (SFI)	76
4.4.2. Eficiența tratamentului prin raportare la comportamentul animalelor asociat durerii (analgesiometrie)	81
4.4.3. Eficiența tratamentului prin raportare la evoluția în dinamică a greutății corporale a animalelor	83
4.4.4. Evaluarea eficienței tratamentului prin studii histologice și de microscopie cu transmisie electronică (TEM)	84
4.4.5. Eficiența tratamentului prin raportare la evoluția în dinamică a valorilor serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6)	85
4.5. Discuții	87
4.6. Concluzii	89
5. Studiul 3 - Evaluarea toxicității tratamentului cu chitosan și a tratamentului cu nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan și compararea celor două metode de tratament raportat la regenerarea nervoasă periferică	91
5.1. Introducere	91

5.2. Ipoteza de lucru/obiective	92
5.3. Material și metodă	92
5.3.1. Chitosan pulbere și nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan: obținere, preparare, administrare	92
5.3.1.1. Obținerea și prepararea chitosanului pulbere (CP) și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan (CMNPs)	92
5.3.1.2. Administrarea chitosanului pulbere și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan	93
5.3.2. Evaluarea toxicității tratamentului cu chitosan și a tratamentului cu nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan	94
5.3.2.1. Distribuția animalelor pe loturi	94
5.3.2.2. Toxicitatea chitosanului și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan prin analiza histologică a țesutului hepatic, renal și splenic	94
5.3.2.3. Toxicitatea chitosanului și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan prin analizarea modificărilor de stres oxidativ de la nivelul țesutului hepatic, renal și splenic	94
5.3.3. Evaluarea comparativă a regenerării nervoase ulterioare administrării chitosanului pulbere și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan	95
5.3.3.1. Inducerea leziunii nervoase periferice	95
5.3.3.2. Compararea celor două metode de tratament prin evaluarea evoluției în dinamică a indicelui funcțional sciatic	96
5.3.3.3. Compararea celor două metode de tratament prin studierea comportamentului animalelor asociat durerii (analgesiometrie)	96
5.3.3.4. Compararea celor două metode de tratament prin studii histologice și de microscopie cu transmisie electronică (TEM)	96
5.3.3.5. Compararea celor două metode de tratament prin evaluarea evoluției în dinamică a greutății corporale a animalelor	97
5.3.3.6. Compararea celor două metode de tratament prin analizarea evoluției în dinamică a nivelurilor serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6)	97
5.3.4. Analiza statistică a parametrilor studiați	97
5.4. Rezultate	97

5.4.1. Evaluarea toxicității chitosanului și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan prin analiza histologică a țesutului hepatic, renal și splenic	97
5.4.2. Evaluarea toxicității chitosanului și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan raportat la modificările de stres oxidativ de la nivelul țesutului hepatic, renal și splenic	100
5.4.3. Eficiența comparativă a celor două metode de tratament prin raportare la evaluarea evoluției indicelui funcțional sciatic (SFI)	104
5.4.4. Eficiența comparativă a celor două metode de tratament prin raportare la evaluarea comportamentului animalelor asociat durerii (analgesiometrie)	104
5.4.5. Eficiența comparativă a celor două metode de tratament prin analiza evoluției în dinamică a greutateii corporale a animalelor	106
5.4.6. Eficiența comparativă a celor două metode de tratament prin evaluarea studiilor histologice și de microscopie cu transmisie electronică (TEM)	106
5.4.7. Eficiența comparativă a celor două metode de tratament prin analiza evoluției în dinamică a valorilor serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6)	107
5.4.8. Caracterizarea nanopaticulelor magnetice și a nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	109
5.4.9. Caracterizarea nanopaticulelor magnetice și a nanoparticulelor magnetice cu chitosan prin microscopie cu transmisie electronică (TEM) și magnetometrie	109
5.5. Discuții	110
5.6. Concluzii	112
6. Concluzii generale (sinteză)	115
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	119
REFERINȚE	121
ANEXE	129

CUVINTE CHEIE: leziune nervoasă periferică, chitosan, nanoparticule magnetice, stres oxidativ.

INTRODUCERE

Leziunile nervoase periferice se produc cu precădere la nivelul membrului superior, cauza cea mai frecventă fiind traumatismul, alte cauze incluzând leziuni prin compresiune și tumori nervoase. În funcție de nervul afectat și de sediul leziunii, pacienții pot prezenta durere, parestezii, hipo-/anestezie, deficit motor până la paralizia membrului afectat.

Tratamentul actual de elecție (golden standard) al leziunilor nervoase periferice este intervenția chirurgicală (sătură/grefă nervoasă autologă), ce se recomandă să fie efectuată în primele 24-48 de ore de la apariția leziunii. Însă, în anumite cazuri, intervenția chirurgicală nu reprezintă calea optimă de tratament, fie pentru că a trecut prea mult timp de la producerea leziunii, fie pentru că leziunea are altă cauză decât traumatismul sau pacientul nu dorește intervenția.

În prezent, tratamentul clinic al leziunilor nervoase periferice se adresează simptomatologiei și include medicație și un program de reabilitare medicală. Cercetările recente în domeniu s-au axat pe identificarea unor molecule specifice pentru promovarea regenerării nervoase, precum peptide, factori de creștere, compuși naturali, nanoparticule. Nanomedicina permite elaborarea unui „teragnostic”, implicând molecule capabile de un diagnostic de înaltă precizie și de un tratament personalizat, cu efecte adverse minime și toxicitate redusă.

Având în vedere aceste aspecte, în prezenta lucrare s-a ales un model experimental de leziune nervoasă periferică (nerv sciatic drept), urmărind efectele asupra regenerării nervoase ale chitosanului, respectiv ale nanoparticulelor magnetice funcționalizate cu chitosan administrate oral, zilnic, sub formă de soluție, timp de 21 de zile. Motivația conceperii acestei metode de tratament s-a regăsit în faptul că, până în prezent, nanoparticulele magnetice s-au folosit în special în patologia nervoasă centrală de tip oncologic, iar nanoparticulele cu chitosan s-au utilizat sub formă de tuburi nervoase în tratamentul chirurgical al leziunilor nervoase periferice. În plus, tratamentul farmacologic actual al leziunilor nervoase periferice se adresează simptomatologiei, cu efecte pe termen scurt și mediu și fără a produce regenerare nervoasă. Astfel, prezenta cercetare și-a propus evaluarea aplicabilității și eficienței tratamentului cu chitosan, respectiv cu nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan în patologia nervoasă de tip periferic.

Originalitatea cercetării constă în urmărirea efectelor administrării orale a chitosanului, respectiv a nanoparticulelor magnetice de fier funcționalizate cu chitosan în regenerarea unei leziuni nervoase periferice, în vederea elaborării unui nou protocol de tratament pentru această patologie. De asemenea, a fost elaborată o metodă proprie

de inducere a leziunii nervoase, iar administrarea nanoparticulelor magnetice a fost efectuată printr-un proces pasiv, respectiv fără a folosi un câmp magnetic exterior.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Pentru tratamentul leziunilor nervoase periferice (LNP) se utilizează în prezent medicație și diverse metode de reabilitare medicală. Niciuna dintre substanțele medicamentoase folosite nu produc regenerarea nervului periferic, iar asupra ameliorării simptomelor, efectele acestora sunt, de regulă, de scurtă durată și incomplete. Metodele de fiziokinetoterapie pot produce regenerarea parțială a nervului periferic și îmbunătățesc funcționalitatea membrului afectat și calitatea vieții pacienților, însă nu există protocoale optim definite referitor la doza prescrisă, durata sau tipul metodei, numărul de ședințe, fiind necesare mai multe studii în domeniu.

Nanomedicina a studiat numeroase tipuri de nanoparticule, singular sau în combinație cu diverse substanțe, cercetările axându-se în principal pe patologia oncologică și degenerativă a sistemului nervos central. O astfel de substanță este chitosanul, produs prin deacetilarea alcalină a chitinei, componentă majoră a exoscheletului crustaceelor. Chitosanul s-a dovedit că are proprietăți fizice și chimice specifice, simulând structura nervilor periferici atunci când este componentă a grefelor nervoase artificiale și posedă potențial regenerator axonal, precum și capacitatea de îmbunătățire a recuperării funcționale și reducerea incidenței apariției neurinomului post-chirurgical.

Nanoparticulele magnetice încărcate cu chitosan (CMNPs) se obțin prin reacții de co-precipitare, prin încapsularea directă a nucleului magnetic cu polimerul. Chitosanul protejează și stabilizează particula magnetică, făcând-o nedetectabilă pentru celulele sistemului imun (în special macrofage), iar suprafața sa poate fi folosită pentru funcționalizări viitoare cu componente specifice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Prezenta cercetare a studiat potențialul regenerator al administrării orale a nanoparticulelor magnetice din oxid de fier funcționalizate cu chitosan, respectiv efectele chitosanului simplu asupra unei leziuni a nervului sciatic drept, indusă experimental la șobolani. De asemenea, s-a efectuat și o comparație între cele două metode de tratament, pentru a observa dacă există diferențe semnificative statistic între acestea, referitor la parametrii studiați, precum și pentru a evalua posibilele efecte adverse asupra altor sisteme și organe a tratamentelor administrate.

Metodologie generală

S-a folosit un model experimental, care a cuprins un număr total de 32 de șobolani Wistar albi sănătoși, de gen masculin, în vârstă de 16-20 săptămâni, cu greutatea între 100 și 290g, procurați prin intermediul Biobazei Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România, cu respectarea normelor etice în vigoare referitoare la cercetarea pe animale (aviz nr. 12/15.01.2020 al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca și autorizația sanitară veterinară nr. 204/10.03.2020 de la Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Cluj).

În funcție de specificul studiului și conform distribuției pe loturi, animalelor le-a fost aplicat tratamentul cu nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan (CMNPs), respectiv cu chitosan simplu, oral, sub formă de soluție, zilnic, timp de 21 de zile. Raportat la datele existente în literatura de specialitate, s-a ales administrarea prin gavaj, fără anestezie prealabilă, a unei doze de 2,5 mg/kg corp/animal de CMNPs, respectiv de chitosan simplu, dizolvate într-o soluție sterilă de NaCl 0,9% (1 mL soluție conținând 0,0145 g de CMNPs, respectiv 0,0145 g de chitosan). Lotul control a primit aceeași doză dintr-o soluție simplă de NaCl 0,9%.

Gradul de regenerare nervoasă periferică a fost analizat prin evaluarea în diferite momente ale studiului a următorilor parametri: indicele funcțional sciatic (SFI), greutatea totală a animalelor, comportamentul animalelor asociat durerii (analgesiometrie), nivelurile serice ale factorului de creștere nervoasă (NGF) și interleukinei-6 (IL-6), precum și prin studii histologice și de microscopie cu transmisie electronică (TEM) și spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX – Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy) a nervului sciatic lezat.

Toxicitatea tratamentelor administrate s-a evaluat prin analiza histologică a ficatului, splinei și rinichilor recoltați la finalul experimentului de la fiecare animal, după eutanasiere, precum și prin dozarea parametrilor stresului oxidativ (malondialdehidă, glutatation redus și glutatation oxidat) de la nivelul organelor menționate.

Rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice, utilizând diverse teste statistice specifice.

Rezultate

Studiul 1 al lucrării a evaluat eficiența nanoparticulelor magnetice din oxid de fier funcționalizate cu chitosan (CMNPs) în regenerarea nervoasă periferică, concluzionând că CMNPs au avut efecte benefice în ceea ce privește recuperarea nervoasă periferică, raportat la toți parametri luați în studiu: scorul SFI, analgesiometrie, evoluția greutateii corporale a animalului, studiile histologice și prin TEM, valorile serice ale IL-6 și NGF.

Prin compararea acestor parametri și analiza statistică a rezultatelor, diferențele dintre animalele lotului tratat cu CMNPs și animalele lotului martor au fost semnificative din punct de vedere statistic. Analiza TEM-EDX a evidențiat prezența CMNPs la nivelul leziunii nervoase, demonstrând mecanismul pasiv de transport al CMNPs. Pe viitor, este necesară efectuarea mai multor studii în această direcție, pentru a se putea formula o concluzie certă, în special din perspectiva utilizării CMNPs în tratamentul leziunilor nervoase periferice la subiecți umani.

Studiul 2 al cercetării a evaluat eficiența tratamentului oral cu chitosan în recuperarea leziunilor nervoase periferice, administrat zilnic, timp de 21 de zile. Parametrii studiați și analiza statistică a rezultatelor au arătat diferențe semnificative între animalele lotului tratat cu chitosan și animalele lotului control, confirmând potențialul regenerativ nervos periferic al chitosanului. Rezultatele studiului susțin ipoteza de lucru a cercetării și pot reprezenta un progres în cercetarea elaborării unui tratament medicamentos eficace în generarea unei recuperări nervoase periferice optime.

Studiul 3 a evaluat toxicitatea tratamentului cu chitosan și a tratamentului cu nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan (prin raportare la un lot control, cu leziune de nerv periferic și tratament placebo – soluție simplă de NaCl 0,9%) și a comparat cele două metode de tratament raportat la regenerarea nervoasă periferică. Evaluarea toxicității s-a efectuat prin analiza histologică a țesuturilor hepatic, renal și splenic, alături de analiza stresului oxidativ la nivelul acestor organe.

Analiza histologică a probelor de țesut hepatic prelevate de la lotul tratat cu CMNPs a evidențiat inflamație periportală semnificativă, în timp ce lotul tratat cu chitosan a prezentat degenerare hepatocitară predominant granulară. Analiza stresului oxidativ a evidențiat că ambele tratamente au avut un efect antioxidant hepatic.

La nivel renal, ambele loturi care au primit tratament au prezentat descumare epitelială tubulară, asociată cu congestie glomerulară moderată și dilatație tubulară, iar analiza stresului oxidativ nu a reliefat diferențe semnificative statistic față de lotul control.

La nivelul splinei, atât la lotul tratat cu CMNPs, cât și la lotul tratat cu chitosan s-au decelat discrete modificări de regresie a foliculilor limfatici din zona marginală și s-au observat diferențe semnificative statistic ale nivelurilor MDA ale lotului tratat cu chitosan și celui tratat cu CMNPs raportat la lotul control, sugerând prezența stresului oxidativ.

Din perspectiva recuperării post leziune nervoasă periferică, atât chitosanul simplu, cât și CMNPs au produs regenerare nervoasă periferică, sugerând că ambele pot reprezenta opțiuni viabile de tratament conservator al LNP, însă sunt necesare mai multe studii în domeniu.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei a constat în analizarea eficacității administrării orale a unui compus natural – chitosan, respectiv a unor nanoparticule magnetice funcționalizate cu chitosan în regenerarea și recuperarea post leziune nervoasă periferică, incompletă, de nerv sciatic, indusă la șobolani.

Conform datelor din literatura de specialitate, până la momentul elaborării protocolului prezentei cercetări, combinația nanoparticule magnetice - chitosan nu a mai fost utilizată ca metodă de tratament conservator al leziunilor nervoase periferice. Totodată, inovativă este și administrarea orală sub formă de soluție, atât a chitosanului simplu, cât și nanoparticulelor cu chitosan, studiile în domeniu axându-se pe conceperea unor tuburi nervoase din chitosan, utilizate pentru tratamentul chirurgical al leziunilor nervoase periferice.

Un alt aspect de originalitate al tezei a fost modalitatea în care a fost indusă leziunea de nerv sciatic, respectiv realizarea unei leziuni incomplete, prin comprimarea nervului cu ajutorul unui fir de sutură.

Contribuția inovativă a tezei se regăsește și în modalitatea pasivă de administrare și transport a nanoparticulelor magnetice, respectiv fără intervenția unui câmp magnetic exterior, cu ajutorul căruia nanoparticulele să fie direcționate ținând spre locul leziunii nervoase, așa cum s-a efectuat în alte studii. Analiza TEM-EDX a demonstrat prezența nanoparticulelor magnetice din oxid de fier funcționalizate cu chitosan la nivelul nervului lezat, astfel că dovedirea existenței acestei alternative de administrare a nanoparticulelor, respectiv prin mecanism pasiv reprezintă un aspect important pentru viitoare studii și pentru tratamentul medicamentos al leziunilor nervoase periferice la subiecți umani.

PHD THESIS SUMMARY

MOLECULES IMPLICATED IN NEUROPROTECTION AND NEUROREGENERATION

PhD Student **Nadina-Liana Pop**

PhD Supervisor Prof.dr. **Remus Orăsan**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Peripheral nerve injuries: general aspects	21
1.1. Peripheral nerve injuries	21
1.1.1. Definition, localization, causes, clasification, physiopathology	21
1.1.1.1. Definition	21
1.1.1.2. Localization	21
1.1.1.3. Causes	22
1.1.1.4. Clasification	22
1.1.1.5. Physiopathology	22
2. Peripheral nerve injuries rehabilitation	25
2.1. Objectives of peripheral nerve injuries rehabilitation	25
2.2. Rehabilitation methods in peripheral nerve injuries	25
2.2.1. Physical exercise	25
2.2.2. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS)	27
2.2.3. Ultrasound	28
2.2.4. Low level laser therapy (laser biostimulation)	28
2.2.5. Extracorporeal shock wave therapy (ESWT)	30
2.2.6. Psychotherapy and psychological rehabilitation	30
2.3. Pharmacological therapy in peripheral nerve injuries	31
2.3.1. Neuropathic pain in peripheral nerve injuries	31
2.3.2. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs treatment	31
2.3.3. Group B vitamins treatment	31
2.3.4. Pharmacological therapy with other drug agents	31
2.3.5. Pharmacological therapy of peripheral nerve injuries pain - current tendencies	32 32
3. Nanomedicine and peripheral nerve injuries	33
3.1. General aspects of nanomedicine and nanoparticles	33
3.2. Nanoparticles in peripheral nerve injuries treatment	33
3.2.1. General aspects of nanoparticles use in peripheral nerve injuries treatment	33 34
3.2.2. Chitosan nanoparticles in peripheral nerve injuries treatment	34
3.2.3. Chitosan nanoparticles toxicity	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	39

2. General methodology	
2.1. Characteristics of the animals used and study duration	39
2.2. Peripheral nerve injury inducement	40
2.3. Treatment administration	40
2.4. Treatment monitorization regarding sciatic functional index (SFI)	41
2.5. Treatment monitorization regarding pain-like behavior (analgesimetry)	41
2.6. Hhistological, transmission electrone microscopy (TEM) and energy-dispersive X-Ray spectroscopy (EDX) evaluation	42
2.7. Treatment monitorization regarding total body weight of the animals	42
2.8. Serum levels of nerve growth factor (NGF) and interleukine-6 (IL-6) evaluation	42
2.9. Statistical analysis	43
3. Study 1 – Chitosan functionalized iron oxide magnetic nanoparticles efficiency in peripheral nerve injuries	44
3.1. Introduction	47
3.2. Working hypothesis/objectives	50
3.3. Material and methods	50
3.3.1. Chitosan functionalized magnetic nanoparticles: preparation and characterization	51
3.3.2. Peripheral nerve injury: animal group distribution, peripheral nerve injury inducement, treatment administration and monitorization	52
3.3.3. Statistical analysis	52
3.4. Results	52
3.4.1. Nanoparticles characterization by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	52
3.4.2. Nanoparticles characterization by electron transmission microscopy and magnetometry	53
3.4.3. Treatment efficiency evaluation regarding sciatic functional index (SFI)	55
3.4.4. Treatment efficiency evaluation regarding pain-like bahvior analysis (analgesimetry)	61
3.4.5. Treatment efficiency evaluation regarding total body weight of the animals	63
3.4.6. Treatment efficiency evaluation regarding histological, transmission electron microscopy (TEM) and energy-dispersive X-Ray spectroscopy (EDX) analysis	64
3.4.7. Treatment efficiency evaluation regarding serum levels of nerve growth factor (NGF) and interleukine-6 (IL-6)	67
3.5. Discussion	68
3.6. Conclusions	71
4. Study 2 – Chitosan oral treatment efficiency evaluation in peripheral nerve injuries	73
4.1. Introduction	73
4.2. Working hypothesis/objectives	75
4.3. Material and methods	75
4.3.1. Chitosan: attainment, preparation, administration	75

4.3.1.1. Attainment and preparation	75
4.3.1.2. Administration	75
4.3.2. Peripheral nerve injury: animal group distribution, peripheral nerve injury inducement, treatment administration and monitorization	75
4.3.3. Statistical analysis	76
4.4. Results	76
4.4.1. Treatment efficiency evaluation regarding sciatic functional index (SFI)	76
4.4.2. Treatment efficiency evaluation regarding pain-like behavior analysis (analgesiometry)	81
4.4.3. Treatment efficiency evaluation regarding total body weight of the animals	83
4.4.4. Treatment efficiency evaluation regarding histological, transmission electron microscopy (TEM)	84
4.4.5. Treatment efficiency evaluation regarding serum levels of nerve growth factor (NGF) and interleukine-6 (IL-6)	85
4.5. Discussion	87
4.6. Conclusions	89
5. Study 3 – Toxicity evaluation of chitosan and chitosan functionalized magnetic nanoparticles treatment and comparison of the two treatment methods regarding peripheral nerve regeneration	91
5.1. Introduction	91
5.2. Working hypothesis/objectives	92
5.3. Material and method	92
5.3.1. Chitosan and chitosan functionalized magnetic nanoparticles: attainment, preparation, administration	92
5.3.1.1. Attainment and preparation	93
5.3.1.2. Administration	
5.3.2. Toxicity evaluation of chitosan and chitosan functionalized magnetic nanoparticles treatment	94
5.3.2.1. Animal group distribution	94
5.3.2.2. Histological analysis of hepatic, renal and splenic tissue	94
5.3.2.3. Oxidative stress modifications analysis	95
5.3.3. Comparison of the two treatment methods regarding peripheral nerve regeneration	95
5.3.3.1. Peripheral nerve injury inducement	96

5.3.3.2. Sciatic functional index analysis	96
5.3.3.3. Pain-like behavior (analgesiometry) analysis	
5.3.3.4. Histological and transmission electron microscopy (TEM) studies evaluation	96
5.3.3.5. Animals total body weight evaluation	97
5.3.3.6. Serum levels of nerve growth factor (NGF) and interleukine-6 (IL-6) analysis	97
5.3.4. Statistical analysis	
5.4. Results	97
5.4.1. Histological analysis of the hepatic, renal and splenic tissue	97
5.4.2. Oxidative stress modifications evaluation	97
5.4.3. Efficiency comparison between the two treatment methods regarding the sciatic functional index (SFI)	100
5.4.4. Efficiency comparison between the two treatment methods regarding pain-like behavior (analgesiometry) analysis	104
5.4.5. Efficiency comparison between the two treatment methods regarding the total body weight of the animals	104
5.4.6. Efficiency comparison between the two treatment methods regarding the histological and electron transmission microscopy (TEM) evaluation	106
5.4.7. Efficiency comparison between the two treatment methods regarding the serum levels of the nerve growth factor (NGF) and interleukine-6 (IL-6)	106
5.4.8. Characterization of the magnetic nanoparticles and chitosan functionalized magnetic nanoparticles by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	107
5.4.9. Characterization of the magnetic nanoparticles and chitosan functionalized magnetic nanoparticles by electron transmission microscopy (TEM) and magnetometry	109
5.5. Discussion	110
5.6. Conclusions	112
6. General conclusions	115
7. Originality and innovative contributions of the thesis	119
REFERENCES	121
APPENDIX	129

KEY WORDS: peripheral nerve injury, chitosan, magnetic nanoparticles, oxidative stress.

INTRODUCTION

Peripheral nerve injuries occur mostly in the upper extremities, trauma being the most frequent cause, other causes include compression lesions and nerve tumors. Depending on the affected nerve and lesion site, patients can present pain, numbness, hypo/-anesthesia, motor deficit and paralysis.

The current treatment (golden standard) for peripheral nerve injuries is surgical intervention, recommended to be performed within the first 24-48 hours after the lesion occurrence. In some cases, surgical intervention is not the optimal treatment due to the patient's disapproval, the nature and localization of the nerve lesion, or too much time lapsed from the nerve injury occurrence.

Presently, the clinical treatment of peripheral nerve injuries regards the symptoms and includes medication and a rehabilitation programme. Recent studies focused on identifying specific molecules for promoting peripheral nerve regeneration, like peptides, growth factors, natural compounds, nanoparticles. Nanomedicine allows the elaboration of a „teragnostic“, involving molecules capable of high precision diagnostic and personalized treatment, with minimal side effects and reduce toxicity.

For the current research, an experimental peripheral nerve (right sciatic nerve) injury model was used, evaluating the nerve regeneration effects of chitosan and chitosan functionalized magnetic nanoparticles, administered orally, in a soluble form, for 21 days. The research motivation for elaborating these treatment methods was that, until present time, magnetic nanoparticles were mostly used for oncological pathologies of the central nervous system, and chitosan nanoparticles were utilized as nerve tubes components for the surgical treatment of the peripheral nerve injuries. The current pharmacological treatment of peripheral nerve injuries does not produce nerve regeneration and has short or medium time effects. Therefore, the present research has evaluated the applicability and efficiency of chitosan and, respectively, chitosan functionalized magnetic nanoparticles for the treatment of peripheral nerve injuries.

The original aspect of the research was the oral administration of the two treatment methods, for the purpose of elaborating a new treatment protocol for peripheral nerve injuries. On the other hand, an original peripheral nerve injury induction method was used, and the administration of the magnetic nanoparticles followed a passive process, without utilizing an exterior magnetic field.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Currently, for the treatment of peripheral nerve injuries (PNI) medication and a rehabilitation medicine programme are used. None of the drugs that are utilized do not produce nerve regeneration and have short term effects on the symptoms improvement.

Rehabilitation medicine programmes can generate partial nerve regeneration and improve function and patient quality of life, but there is a large variability of the used methods, the number of sessions, dosage, period of treatment, so a clear and proper protocol does not exist.

Nanomedicine studied various types of nanoparticles, alone or in combination with different substances, focusing on oncological and degenerative pathologies of the central nervous system. Chitosan is such a natural compound, obtained by alkaline deacetylation of chitin, the major component of crustaceans' exoskeleton. Studies revealed that chitosan has specific physical and chemical properties that simulate peripheral nerves' structure when it is part of artificial nerve grafts and has the capacity to enhance functional rehabilitation and to reduce the frequency of post-surgery neurinoma.

Chitosan functionalized magnetic nanoparticles are obtained by co-precipitation reactions, by encapsulating the magnetic core with the polymer. Literature data revealed that chitosan, part of chitosan functionalized magnetic nanoparticles—CMNPs, has the ability to protect and stabilize the magnetic nanoparticle, which makes it non-detectible for the immune system and useful for future functionalization.

PERSONAL CONTRIBUTION

The present research studied the regenerative potential of oral administrated chitosan and, respectively of chitosan functionalized magnetic nanoparticles on a sciatic nerve lesion induced in rats. A comparison between the two treatment methods was elaborated, to observe if there are any statistically significant differences and also for the study of potential side effects on other organs.

General methodology

An experimental model was used, which included a total number of 32 healthy white male Wistar rats, age between 16 and 20 weeks, weight between 100 and 290g (provided by the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy's Research Base, Cluj-Napoca, Romania). The study observed the ethical principles regarding animal research: authorization no. 12/15.01.2020 of the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy's Cluj-Napoca Ethical Board and authorization no. 204/10.03.2020 of the Animal and Food Safety Direction Cluj.

Regarding animal group distribution, the rats received treatment with simple chitosan or with chitosan CMNPs, as an oral solution, daily, for 21 days. Each animal received a 2.5 mg/kg/day of CMNPs, respectively of chitosan, in a NaCl 0.9% sterile solution (1 mL of solution containing 0.0145 g of CMNPs, respectively of simple

chitosan), administrated by gavage, without anesthesia. The dosage was established according to the literature data that used chitosan for different treatment methods or for nanotoxicity evaluation. The control group received the same dosage of a simple NaCl 0.9% solution.

The peripheral nerve regeneration status was evaluated at different moments of the study regarding the sciatic functional index (SFI), total body weight of the animals, pain-like behavior (analgesimetry), serum levels of nerve growth factor (NGF) and interleukin-6 (IL-6), as well as histological, transmission electron microscopy (TEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) studies of the injured sciatic nerve.

The toxicity of the used treatments was assessed by histological analysis of the hepatic, renal and splenic tissues, at the end of the experiment, after euthanasia and by evaluating oxidative stress parameters (malondialdehyde-MDA, reduced and oxidated glutathione).

The results were statistically analyzed with specific tests.

Results

The first study evaluated the efficiency of CMNPs in peripheral nerve regeneration, and concluded that CMNPs could provide nerve regeneration regarding the studied parameters: SFI score, analgesimetry, total body weight of the animals evolution, histological and TEM studies, serum levels of IL-6 and NGF.

The obtained results for the treated group (CMNPs group) were statistically significant different by comparison with the control group. TEM-EDX analysis revealed the presence of the CMNPs at the nerve lesion site, demonstrating the passive transport mechanism of the CMNPs. Further, more studies are needed in order to formulate a certain conclusion and to evaluate the use of CMNPs in human subjects.

The second study evaluated the efficiency of oral chitosan treatment, administrated orally, for 21 days, in the recovery after peripheral nerve injury. The studied parameters and the statistical analysis of the results showed significant differences between the animals that received chitosan treatment and the control group, and confirmed the peripheral nerve regeneration potential of chitosan. The results encouraged the study hypothesis and can represent a progress in elaborating a new non-invasive treatment for peripheral nerve injuries.

The third study evaluated the toxicity of chitosan and, respectively of CMNPs treatment (by comparison with a control group, with peripheral nerve injury and placebo treatment – simple NaCl 0.9% solution) and compared the two treatment methods efficiency in peripheral nerve regeneration. Toxicity evaluation was observed by histological analysis of the hepatic, renal and splenic tissue, and by evaluating oxidative stress parameters.

Hepatic histological analysis revealed significant periportal inflammation for the CMNPs group and hepatic degeneration for the chitosan group. Oxidative stress analysis showed that both treatment methods had an antioxidant hepatic effect.

At renal level, histologically, both treatment groups presented tubular epithelial desquamation, with moderate glomerular congestion and tubular dilatation, while oxidative stress analysis did not reveal any significant differences by comparison with the control group.

For the splenic tissue, the histological evaluation pointed mild regression modifications of the lymphatic follicles from the marginal area for both treatment groups. There were statistical significant differences of the MDA levels of both treatment groups by comparison with the control group, suggesting the presence of oxidative stress.

From the peripheral nerve regeneration perspective, both simple chitosan and CMNPs provided nerve regeneration, suggesting that both methods can represent viable non-invasive treatment options for peripheral nerve injuries, but more studies are needed.

Originality and innovative contribution of the thesis

The originality of the thesis consisted in the analysis of the efficiency of the oral administration of a natural compound – chitosan, respectively of chitosan functionalized magnetic nanoparticles for the regeneration and rehabilitation after incomplete sciatic nerve injury, induced in rats.

According to literature data, until the time of elaboration of the present research protocol, the magnetic nanoparticles - chitosan combination was not used before for the treatment of peripheral nerve injuries. Another innovative aspect was the oral soluble form of administering the simple chitosan and, respectively the CMNPs, while most studies focused on elaborating chitosan nerve tubes for the surgical treatment of peripheral nerve injuries.

The method in which the sciatic nerve injury was induced, in an incomplete manner is another original point of the current research.

The innovative contribution of the thesis is also found in the passive administration and transport method of the magnetic nanoparticles, without the intervention of an exterior magnetic field. TEM-EDX analysis revealed the presence of the iron oxide magnetic nanoparticles at the nerve lesion site, which demonstrated the passive transport mechanism of the nanoparticles, when administered orally, an important aspect for future studies and for the non-invasive treatment of peripheral nerve injuries in humans.