



Research Article

Effects of Citicoline and Atorvastatin Administration on the Regenerative Capacity of the Distal Segment of the Transected Sciatic Nerve in Conditions of Delayed Nerve Repair

Samira Bolandghamat¹, Morteza Behnam-Rassouli^{2*}, Nasser Mahdavi-Shahri², Ali Moghimi²

¹Ph.D. in Animal Science (Animal Physiology), Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

²Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Morteza Behnam-Rassouli, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. E-mail: behnam@um.ac.ir.

DOI: [10.32592/nkums.15.3.1](https://doi.org/10.32592/nkums.15.3.1)

How to Cite this Article:

Bolandghamat S, Behnam-Rassouli M, Mahdavi-Shahri N, Moghimi A. Effects of Citicoline and Atorvastatin Administration on the Regenerative Capacity of the Distal Segment of the Transected Sciatic Nerve in Conditions of Delayed Nerve Repair. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(3):1-10. DOI: [10.32592/nkums.15.3.1](https://doi.org/10.32592/nkums.15.3.1)

Received: 04 Apr 2023

Accepted: 12 Aug 2023

Keywords:

Atorvastatin
Citicoline
Delayed nerve repair
Nerve repair
Sciatic nerve

Abstract

Introduction: The reduced organ function following delayed nerve repair highlights the need for pharmacological interventions. In this regard, many chemical agents have been administered after nerve injury; however, their functional outcomes are not satisfying yet. The present study aimed to evaluate the effects of the administration of citicoline and atorvastatin on the regenerative capacity of the distal end of the transected sciatic nerve throughout a delayed nerve repair period.

Method: The sciatic nerve of male rats (250-300 g) was transected, and the animals were intraperitoneally administrated citicoline (200 mg/kg, n=5), atorvastatin (5 mg/kg, n=5), citicoline + atorvastatin, and vehicles (control groups 1 and 2, n=5) for one month. In the sham group (n=5), the sciatic nerve was only exposed. After one month, the transected nerve was repaired. Fourteen weeks after surgical repair, morphometric and electron microscopic evaluations were performed on the nerve.

Results: In the present study, improvement in the structural (fiber diameter, axon diameter, and myelin thickness, etc.) and ultrastructural (degree of myelin destruction) indices of the distal segment of the nerve was observed in the citicoline and atorvastatin groups compared to the control groups ($P < 0.01$). In addition, the nerve structural and ultrastructural indices in the citicoline + atorvastatin group were better than each citicoline and atorvastatin group.

Conclusion: The results of this study showed that the administration of citicoline and atorvastatin leads to maintaining the regeneration capacity of the distal part of the nerve in the condition of delayed nerve repair.



بررسی اثرات تجویز سیتی کولین و آتورواستاتین بر ظرفیت ترمیمی بخش دیستال عصب سیاتیک قطع شده در شرایط ترمیم عصب با تأخیر

سمیرا بلندقامت^۱، مرتضی بهنام رسولی^{۲*}، ناصر مهدوی شهری^۲، علی مقیمی^۲

^۱دکترای علوم جانوری (فیزیولوژی جانوری)، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
^۲استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

*نویسنده مسئول: مرتضی بهنام رسولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران. ایمیل: behnam@um.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.15.3.1

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱	مقدمه: کاهش عملکرد اندام پس از ترمیم تأخیری عصب، نیاز به مداخلات دارویی را برجسته می‌کند. به این منظور، بسیاری از داروها پس از آسیب عصبی تجویز شده است؛ اما نتایج عملکردی آن‌ها هنوز رضایت‌بخش نیست. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات تجویز سیتی کولین و آتورواستاتین، در طول دوره تأخیر در ترمیم عصب، بر ظرفیت بازسازی انتهای دیستال عصب سیاتیک قطع شده انجام شد.
واژگان کلیدی:	روش کار: عصب سیاتیک موش‌های صحرایی نر (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) قطع شد و حیوانات سیتی کولین (۲۰۰ mg/kg, n=۵)، آتورواستاتین (۵ mg/kg, n=۵)، سیتی کولین + آتورواستاتین و حلال داروها (گروه‌های کنترل ۱ و ۲، n=۵) را به صورت داخل صفاقی به مدت ۱ ماه دریافت کردند. در گروه شم (n=۵)، عصب فقط آشکار شد. بعد از یک ماه، عصب قطع شده با یک آلوگرافت ترمیم شد. چهارده هفته بعد از ترمیم عصب، ارزیابی‌های ریخت‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی بر روی عصب انجام شد.
سیتی کولین آتورواستاتین ترمیم عصب ترمیم عصب با تأخیر عصب سیاتیک	یافته‌ها: در پژوهش حاضر، بهبود شاخص‌های ساختاری (قطر فیبر، قطر آکسون و ضخامت میلین و...) و فراساختاری (درجه تخریب میلین) بخش دیستال عصب در گروه‌های سیتی کولین و آتورواستاتین در مقایسه با گروه‌های کنترل مشاهده شد ($P < 0.01$)؛ همچنین، شاخص‌های ساختاری و فراساختاری عصب در گروه سیتی کولین + آتورواستاتین بهتر از هر یک از گروه‌های سیتی کولین و آتورواستاتین بود. نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز سیتی کولین و آتورواستاتین منجر به حفظ ظرفیت بازسازی بخش عصب دیستال عصب در شرایط تأخیر در ترمیم عصب می‌شود.

مقدمه

درباره داروهایی با اثربخشی بیشتر بر ترمیم عصب همچنان ادامه دارد. سیتی کولین که به نام سیتیدین-۵'-دی فسفوکولین (CDP-کولین) شناخته می‌شود، پیش‌ساز داخل سلولی فسفاتیدیل کولین است که فراوان‌ترین فسفولیپید موجود در غشاهای سلول است [۵]. سیتی کولین دارای اثرات درمانی در اختلالات عصبی است [۶-۸]. این اثرها ناشی از افزایش سنتز فسفولیپیدها و کاهش تخریب آن‌ها از طریق مهار فعالیت فسفولیپاز A2 است [۹، ۱۰]. آنزیم فسفولیپاز A2 باعث تولید لیوفسفاتیدیل کولین و آراشیدونیک اسید می‌شود. LPC در تجزیه میلین دخالت دارد و آراشیدونیک اسید در تشکیل گونه اکسیژن واکنش‌دهنده، پراکسیداسیون لیپیدها و شروع پاسخ‌های التهابی نقش دارد [۹]. کاربرد موضعی یا سیستمیک سیتی کولین، سیتیدین، کولین یا سیتیدین + کولین در موش صحرایی باعث افزایش ترمیم عصب و بهبود عملکرد پس از آسیب عصب سیاتیک می‌شود [۱۱-۱۵]. این یافته‌ها نشان می‌دهند که اثرات درمانی سیتی کولین ممکن است ناشی از متابولیت‌های حاصل از آن، یعنی کولین، سیتیدین یا هر دو

آسیب عصب محیطی علل متعددی مانند تروما و اختلالات پزشکی دارد و معمولاً همراه با درد نوروپاتیک و ناتوانی عملکردی است [۱]. در ایران، میزان شیوع آسیب عصب محیطی در مصدومان ناشی از حوادث ۱/۳ درصد است که بیشتر در گروه سنی ۲۱ تا ۳۰ سال مشاهده می‌شود [۲]. بیشتر آسیب‌های عصب محیطی در اندام‌های فوقانی رخ می‌دهند و می‌توانند تأثیر مخربی بر کیفیت زندگی بیمار بگذارند [۳]. با وجود پیشرفت‌هایی که در تکنیک‌های جراحی عصبی در چند سال اخیر صورت گرفته است، بهبود عملکرد پس از درمان آسیب عصبی رضایت‌بخش نیست. در واقع، ترمیم موفقیت‌آمیز عصب نه تنها به استراتژی جراحی، بلکه به مکانیسم‌های زیستی دخیل در آسیب ترومایی عصب نیز بستگی دارد. تأخیر طولانی مدت در ترمیم عصب باعث آتروفی سلول‌های شوان و بافت هدف و افزایش بیان فاکتورهای دخیل در تشکیل اسکار، مانند کلاژن می‌شود [۴]. کاهش عملکرد اندام به دنبال تأخیر در ترمیم عصب، لزوم مداخلات دارویی در این زمینه را آشکار می‌سازد. تاکنون داروهای مختلفی بعد از آسیب عصبی تجویز شده‌اند؛ اما بهبود عملکرد رضایت‌بخش نیست؛ بنابراین، تحقیقات

باشد [۱۳، ۱۲] به همین ترتیب، تجویز سیتی کولین بعد از قطع عصب سیاتیک، از تشکیل اسکار دور عصب و ادم عصب جلوگیری می‌کند [۱۴، ۱۱]. آتورواستاتین دارویی از خانواده استاتین‌ها است که برای درمان کلسترول بالا استفاده می‌شود [۱۶]. استاتین‌ها مهارکننده آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوکوتاریل-کوآنزیم A ردوکتاز هستند که آنزیم محدودکننده سرعت در مسیر سنتز کلسترول است [۱۷]. پیش‌درمانی با آتورواستاتین (۵ mg/kg) قبل از آسیب له‌شدگی عصب سیاتیک باعث بهبود عملکرد و شاخص‌های ریخت‌شناسی عصب در موش صحرایی می‌شود [۱۸]. درحالی‌که پیش‌درمانی با دوز ۱۰ mg/kg آن تأثیری بر بهبود حرکت سیبل‌های موش صحرایی پس از آسیب له‌شدگی عصب صورت ندارد [۱۹]؛ علاوه بر این، تجویز آتورواستاتین (۵ mg/kg) بعد از آسیب عصب سیاتیک نیز باعث بهبود شاخص‌های عملکردی و الکتروفیزیولوژیکی عصب می‌شود [۲۰]. در این رابطه، نتایج مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که آتورواستاتین باعث کاهش استرس اکسیداتیو [۲۱، ۱۸]، کاهش آپوپتوز [۱۸]، مهار فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز [۲۲، ۱۸]، کاهش التهاب [۲۳، ۲۲، ۱۸] و کاهش نفوذپذیری سد خونی عصبی [۱۸] در اعصاب محیطی آسیب‌دیده می‌شود؛ علاوه بر این، آتورواستاتین باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد آکسونی، مانند *Gap-43* (Growth Associated Protein 43)، پروتئین پایه میلین (*Myelin basic protein*)، فاکتور نوروتروفیک مغزگانی و کلاژن پس از آسیب عصب محیطی می‌شود [۱۸]. هرچند مطالعات قبلی اثرات مفید داروهای سیتی کولین و آتورواستاتین را بر ترمیم عصب به‌دنبال جراحی ترمیمی فوری عصب نشان داده‌اند [۲۰، ۱۸، ۱۵-۱۱]، اثرات آن‌ها در مدل تأخیر در جراحی ترمیمی عصب تاکنون مطالعه نشده است؛ از این‌رو، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات تجویز سیتی کولین و آتورواستاتین بر حفظ ظرفیت ترمیمی بخش دیستال عصب قطع‌شده در شرایط ترمیم عصب با تأخیر بوده است.

روش کار

حیوانات آزمایشی

تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم و سن ۳ ماه، در شرایط استاندارد محیطی با دسترسی آزادانه به آب و خوراک در حیوان‌خانه دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد پرورش داده شدند. در تمام مراحل پژوهش، مقررات اخلاق زیستی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. دستورالعمل آزمایشی توسط کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی به تصویب رسید (ID: IR.UM.REC.1398.090). حیوانات به شش گروه به‌صورت زیر تقسیم شدند: ۱. گروه سیتی کولین (n=۵): حیوانات پس از جراحی قطع عصب سیاتیک، دوز ۲۰۰ mg/kg سیتی کولین (داروسازی البرز، ایران) را به‌صورت محلول در سرم فیزیولوژی به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت یک ماه دریافت کردند [۲۴]؛ ۲. گروه آتورواستاتین (n=۵): پس از جراحی قطع عصب سیاتیک، دوز ۵ mg/kg آتورواستاتین (داروسازی پورسینا، ایران) [۲۰] در دی‌متیل‌سولفوکساید و سرم فیزیولوژی و توئین

۸۰ (به‌نسبت حجمی ۵:۹۴:۱) حل شد و به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت یک ماه به حیوانات تزریق شد؛ ۳. گروه سیتی کولین + آتورواستاتین (n=۵): پس از قطع عصب سیاتیک، حیوانات سیتی کولین و آتورواستاتین را به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت یک ماه دریافت کردند؛ ۴. گروه کنترل ۱ (n=۵): پس از قطع عصب سیاتیک، حیوانات سرم فیزیولوژی را به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت یک ماه دریافت کردند؛ ۵. گروه کنترل ۲ (n=۵): پس از قطع عصب سیاتیک، حیوانات حلال آتورواستاتین را به‌صورت داخل صفاقی به‌مدت یک ماه دریافت کردند؛ ۶. گروه شم (n=۵): در این گروه، عصب سیاتیک فقط آشکار شد و قطع نشد.

روش جراحی

جراحی تحت شرایط آسپتیک انجام شد. بعد از بی‌هوشی عمیق حیوانات (کتامین ۹۰ mg/kg + زایلازین ۵ mg/kg، آلفاسان، هلند)، عصب سیاتیک پای راست آن‌ها نمایان شده و در قسمت میانی ران با تیغ جراحی برش داده شد. برای جلوگیری از ترمیم خودبه‌خودی عصب، هر دو انتهای عصب بر روی خودش برگردانده شد و با استفاده از نخ بخیه نایلون ۸-۰ به‌صورت ای‌نورال به خودش بخیه شد (به‌شکل حلقه‌مانند) [۲۵]. برای اطمینان بیشتر از جوش‌نخوردن دو انتهای عصب در صورت پارگی نخ بخیه، انتهای پروکسیمال عصب در زیر عضله سدادی درونی قرار گرفت. عضله و پوست به‌طور جداگانه با نخ بخیه سیلک ۴-۰ بخیه شدند. در گروه شم، عصب سیاتیک فقط نمایان شد و قطع نشد. به‌منظور پروفیلاکسی، آنتی‌بیوتیک سفازولین (داروسازی اکسیر، ایران) با دوز ۳۰ mg/kg به‌صورت زیرجلدی نیم ساعت قبل از شروع جراحی و پس از آن روزانه به‌مدت ۲ روز تزریق شد [۲۶، ۲۷]؛ همچنین، حیوانات بعد از پایان جراحی داروی ضد درد ملوکسیکام (۲ mg/kg)، ملوکسیوت، داروسازی رازک، ایران) را به‌صورت زیرجلدی دریافت کردند. این دارو نیز روزانه به‌مدت ۲ روز تزریق شد [۲۸]. شروع تیمارهای دارویی بلافاصله بعد از پایان جراحی بود و سپس، روزانه به‌مدت یک ماه به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. بعد از یک ماه، حیوانات دوباره بی‌هوش شدند و عصب سیاتیک نمایان شد. ۲ میلی‌متر از انتهای پروکسیمال و دیستال عصب برداشته شد تا بافت نروما (Neuroma) حذف شود. سپس، شکاف بین دو انتهای عصب با یک آلوگرافت به‌طول ۶ میلی‌متر از عصب سیاتیک موش‌های سالم به‌روش ای‌نورال ترمیم شد (نخ بخیه ۰-۸). پوست و عضله بسته شدند و حیوانات به‌مدت ۱۴ هفته بعد از آن نگهداری شدند. به‌دلیل اتوتومی (خوردن انگشتان پا)، انجام تست‌های رفتاری مقدور نبود. در پایان هفته چهاردهم، حیوانات کشته شدند و از بخش‌های گرافت و دیستال عصب نمونه‌برداری شد.

ارزیابی ریخت‌سنجی عصب

پنج میلی‌متر نمونه از گرافت و بخش دیستال عصب جدا شد و برای تثبیت‌شدن در فیکساتور گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد قرار گرفت. نمونه‌ها در بافری که در آن فیکساتور تهیه شده بود، شسته شدند و مراحل آب‌گیری با اتانول صعودی انجام شد. سپس، نفوذ تدریجی با حلال استاندارد اکسیدپروپیلن به‌مدت ۳۰ دقیقه انجام شد تا جایگزین الکل ۱۰۰ درصد

شدند. به دلیل کاهش تعداد نمونه‌ها در هر گروه ($n=5$)، مقایسه گروه‌ها با استفاده از آزمون غیرپارامتری Kruskal-Wallis برای نمونه‌های مستقل برای بخش‌های گرفت و دیستال (Non-parametric independent-samples Kruskal-Wallis test) به‌طور جداگانه انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در این آزمون ($P\text{-value} < 0.05$)، Mann-Whitney U آزمون غیرپارامتری برای کاهش خطای نوع اول، سطح معنی‌داری 0.01 و سطح اطمینان 99 درصد در نظر گرفته شد. $P=0.01$ value از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد [۳۵].

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی ریخت‌سنجی عصب سیاتیک

نتایج حاصل از ارزیابی ریخت‌سنجی عصب در جداول ۱ و ۲ آمده است. تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب با گروه شم (سالم) نشان دادند ($P < 0.01$) (جدول ۱). در بخش دیستال عصب، در گروه‌های سیتی‌کولین، اتورواستاتین و سیتی‌کولین + اتورواستاتین افزایش معنی‌دار قطر فیبرها، قطر آکسون‌ها، ضخامت میلین، مساحت سطحی فیبر و کاهش معنی‌دار مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی نسبت به گروه‌های کنترل ۱ و ۲ مشاهده شد ($P < 0.01$) (شکل ۱) (جدول ۱). همچنین، در بخش دیستال عصب، در گروه‌های اتورواستاتین و سیتی‌کولین + اتورواستاتین افزایش معنی‌دار تراکم فیبرها نسبت به گروه کنترل ۲ (حلال اتورواستاتین) مشاهده شد ($P < 0.01$)؛ درحالی‌که هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ میانگین تراکم فیبرها در بخش دیستال عصب در گروه سیتی‌کولین در مقایسه با گروه کنترل ۱ (حلال سیتی‌کولین) مشاهده نشد (جدول ۱). مقایسه بین سه گروه سیتی‌کولین، اتورواستاتین و سیتی‌کولین + اتورواستاتین نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ شاخص‌های ساختاری عصب دو گروه سیتی‌کولین و اتورواستاتین وجود ندارد (جدول ۲). در گروه سیتی‌کولین + اتورواستاتین افزایش معنی‌دار تراکم فیبرها و کاهش معنی‌دار مساحت فضای داخل فاسیکولی بخش دیستال عصب در مقایسه با گروه اتورواستاتین مشاهده شد ($P < 0.01$). از طرفی، میانگین ضخامت میلین در گروه سیتی‌کولین + اتورواستاتین به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه سیتی‌کولین یا اتورواستاتین بود ($P < 0.01$). هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ قطر فیبرها، قطر آکسون‌ها و مساحت فیبرها بین سه گروه مشاهده نشد (جدول ۲).

در این پژوهش، دو گروه کنترل ۱ (حلال سیتی‌کولین) و کنترل ۲ (حلال اتورواستاتین) تفاوت معناداری را از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی بخش دیستال عصب نشان ندادند؛ همچنین، در بخش گرفت، هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب بین گروه‌های سیتی‌کولین، اتورواستاتین، سیتی‌کولین + اتورواستاتین و کنترل ۱ و ۲ مشاهده نشد (جدول ۱).

شود. در مرحله بعد، نفوذ تدریجی با رزین انجام شد تا در نهایت، بافت در رزین خالص قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها در رزین قالب‌گیری شدند و برش‌های عرضی نیمه‌نازک از نمونه‌ها با اولترامیکروتوم تهیه شد. پس از آن، نمونه‌ها با رنگ تولوئیدین بلو ۱ درصد رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری (مدل Olympus Bx51، ژاپن) بررسی شدند [۲۹].

عکس‌برداری از برش‌ها با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ (مدل Olympus DP71، ژاپن) انجام شد. بررسی مورفومتری تصاویر با استفاده از نرم‌افزارهای ImageJ (نسخه 1.51h) و Digimizer (نسخه 5.4.1) انجام شد [۳۰]. تراکم فیبرها در چهار ناحیه غیرمجاور که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند، در بزرگ‌نمایی $400\times$ برابر اندازه‌گیری شد [۳۰]؛ همچنین، میانگین مساحت سطح مقطع فیبرهای میلین‌دار، قطر فیبر میلین‌دار، قطر آکسون، ضخامت میلین و مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی (فضای بین فیبرهای میلین‌دار) در چهار ناحیه با بزرگ‌نمایی $1000\times$ برابر قطر فیبر از روی مساحت فیبر با استفاده از فرمول $(\pi \times \text{مساحت فیبر} \times \sqrt{2}) = \text{قطر فیبر}$ ، محاسبه شد [۳۱].

ضخامت میلین نیز از فرمول $(D-d)/2 = \text{ضخامت میلین}$ محاسبه شد که در آن D قطر فیبر و d قطر آکسون است [۳۲]. با توجه به اینکه مساحت پایه هر خانه بررسی‌شده $1000 \mu\text{m}^2$ بود، مساحت خالص فضای داخل فاسیکولی در هر خانه طبق فرمول $(a - b) = 1000$ محاسبه شد. در این فرمول، a فضای داخل فاسیکولی خالص و b مجموع مساحت‌های سطحی تمام فیبرهای میلین‌دار در هر خانه است.

ارزیابی عصب با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM-Transmission electron microscopy)

دو نمونه عصب از هر گروه به‌طور تصادفی برای ارزیابی با TEM در نظر گرفته شد. آماده‌سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. برای بررسی بخش دیستال عصب با TEM (مدل LEO-912AB، Zeiss، آلمان)، برش‌های نازک (با ضخامت 30 تا 40 نانومتر) از قالب‌های رزینی زده شد. برش‌ها با اوراتیل استات 2 درصد و سترات سرب $4/0$ درصد رنگ‌آمیزی و زیر TEM مشاهده شدند [۲۹]. از هر لام، چندین میکروگراف الکترونی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف تهیه شد.

در هر بزرگ‌نمایی، از محل‌های متفاوت یک لام تصویربرداری انجام شد. ارزیابی کمی ساختار میلین با استفاده از نوعی سیستم درجه‌بندی انجام شد. طبق این درجه‌بندی، درجه صفر برای طبیعی بودن غلاف میلین، درجه یک برای وزیکول‌دار بودن غلاف میلین، درجه دو برای جداسازی لایه‌های میلین، درجه سه برای نمای لانه زنبوری میلین و درجه چهار برای فروریختگی کلی ساختار میلین به کار برده شد [۳۳].

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 25 تجزیه و تحلیل

جدول ۱. نتایج حاصل از ارزیابی ریخت‌سنجی بخش‌های گرافت و دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب.

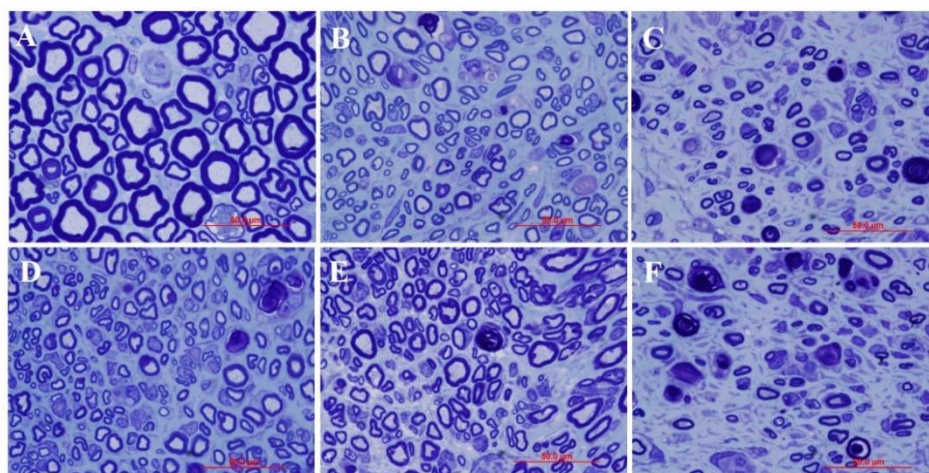
گروه‌ها	میانگین تراکم فیبر در $(\mu m^2 \times 5000)$	میانگین قطر فیبر (μm)	میانگین قطر آکسون (μm)	میانگین ضخامت میلین (μm)	میانگین مساحت فیبر (μm^2)	مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی $(1000 \mu m^2)$
شم	۱۳/۵	۱۹/۸۰	۱۲/۴۹	۳/۶	۳۰۷/۸۱	۳۰۰/۱۴
گرافت سیتی کولین	۳۸ ^a	۸/۹۵ ^a	۶/۵۱ ^a	۱/۲۲ ^a	۶۲/۷۴ ^a	۵۳۰ ^a
دیستال						
سیتی کولین	۲۸/۵۰ ^a	۸/۰۸ ^{a, b}	۵/۶۰ ^{a, b}	۱/۲۴ ^{a, b}	۵۱/۳۳ ^{a, b}	۶۰۲/۴۶ ^{a, b}
گرافت						
آتورواستاتین	۳۶ ^a	۹ ^a	۶/۵۶ ^a	۱/۲۲ ^a	۶۳/۵۸ ^a	۵۴۱ ^a
دیستال						
آتورواستاتین	۲۷/۵ ^{a, c}	۷/۹۵ ^{a, c}	۵/۳۳ ^{a, c}	۱/۳۱ ^{a, c}	۴۹/۷۵ ^{a, c}	۶۰۴/۷۶ ^{a, c}
گرافت سیتی کولین + آتورواستاتین	۳۷ ^a	۸/۹۶ ^a	۶/۵۱ ^a	۱/۲۳ ^a	۶۳/۰۲ ^a	۵۲۴ ^a
دیستال						
سیتی کولین + آتورواستاتین	۳۴ ^{a, c}	۸/۳۷ ^{a, c}	۵/۳۷ ^{a, c}	۱/۵۶ ^{a, c}	۵۴/۸۶ ^{a, c}	۵۰۴/۶۸ ^{a, c}
گرافت کنترل ۱	۴۲ ^a	۹/۵۶ ^a	۶/۹۶ ^a	۱/۳۰ ^a	۷۱/۷۴ ^a	۵۲۸/۷۳ ^a
دیستال کنترل ۱	۱۹ ^a	۵/۹۰ ^a	۴/۱۸ ^a	۰/۸۶ ^a	۲۷/۳۸ ^a	۸۶۹/۵۵ ^a
گرافت کنترل ۲	۴۱ ^a	۹/۳۰ ^a	۶/۸۰ ^a	۱/۲۵ ^a	۶۷/۸۹ ^a	۵۱۰ ^a
دیستال کنترل ۲	۲۰ ^a	۵/۷۹ ^a	۴/۰۹ ^a	۰/۸۵ ^a	۲۶ ^a	۸۶۲/۳۶ ^a

داده‌ها به صورت میانه نشان داده شده‌اند. مقایسه بخش‌های گرافت و دیستال گروه‌ها با استفاده از Mann-Whitney U صورت گرفت ($n = \Delta$). a در مقایسه با گروه شم، b در مقایسه با گروه کنترل ۱ و c در مقایسه با گروه کنترل ۲ معنی‌دار در نظر گرفته شده است ($P < 0.01$).

جدول ۲. مقایسه گروه‌های تیمار دارویی (سیتی کولین، آتورواستاتین، سیتی کولین + آتورواستاتین) از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی بخش دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب.

گروه‌ها	میانگین تراکم فیبر در $(\mu m^2 \times 5000)$	میانگین قطر فیبر (μm)	میانگین قطر آکسون (μm)	میانگین ضخامت میلین (μm)	میانگین مساحت فیبر (μm^2)	مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی $(1000 \mu m^2)$
دیستال	۲۸/۵۰	۸/۰۸	۵/۶۰	۱/۲۴	۵۱/۳۳	۶۰۲/۴۶
سیتی کولین						
دیستال	۲۷/۵	۷/۹۵	۵/۳۳	۱/۳۱	۴۹/۷۵	۶۰۴/۷۶
آتورواستاتین						
دیستال						
سیتی کولین + آتورواستاتین	۳۴ ^b	۸/۳۷	۵/۳۷	۱/۵۶ ^{a, b}	۵۴/۸۶	۵۰۴/۶۸ ^b

داده‌ها به صورت میانه همراه با کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین داده (داخل کروشه) نشان داده شده‌اند. مقایسه هر گروه با گروه دیگر با استفاده از آزمون Mann-Whitney U انجام شد ($n = \Delta$). a در مقایسه با گروه سیتی کولین و b در مقایسه با گروه آتورواستاتین معنی‌دار در نظر گرفته شده است ($P < 0.01$).



شکل ۱. برش‌های نیمه‌نازک مقطع عرضی بخش دیستال عصب سیاتیک با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو. (A) گروه شم، (B) گروه سیتی کولین، (C) گروه کنترل منفی ۱ (سالیین)، (D) گروه آتورواستاتین، (E) گروه سیتی کولین + آتورواستاتین، (F) گروه کنترل منفی ۲ (حلال آتورواستاتین). مقیاس خطی ۵۰ μm .

نتایج حاصل از ارزیابی بخش دیستال عصب سیاتیک با استفاده

از TEM

نتایج حاصل از ارزیابی میکروگراف‌های الکترونی بخش دیستال عصب نشان داد که در گروه شم تقریباً تمام فیبرها دارای غلاف میلین سالم (تخریب درجه صفر) بودند و فقط ۴ درصد فیبرها تخریب میلین درجه یک (غلاف میلین وزیکول‌دار) را نشان دادند که احتمالاً ناشی از تأخیر در تثبیت بافت است (اشکال ۲ و ۳).

در بخش دیستال عصب گروه سیتی‌کولین، ۶۵ درصد فیبرها غلاف میلین سالم داشتند.

درحالی‌که ۱۵ درصد فیبرها تخریب میلین درجه یک، ۱۲ درصد فیبرها تخریب میلین درجه دو (جداشدگی غلاف میلین)، ۴ درصد فیبرها تخریب میلین درجه سه (نمای لانه زنبوری میلین) و ۴ درصد فیبرها تخریب میلین درجه چهار (فروریختگی کلی ساختار میلین) را نشان دادند (شکل ۳).

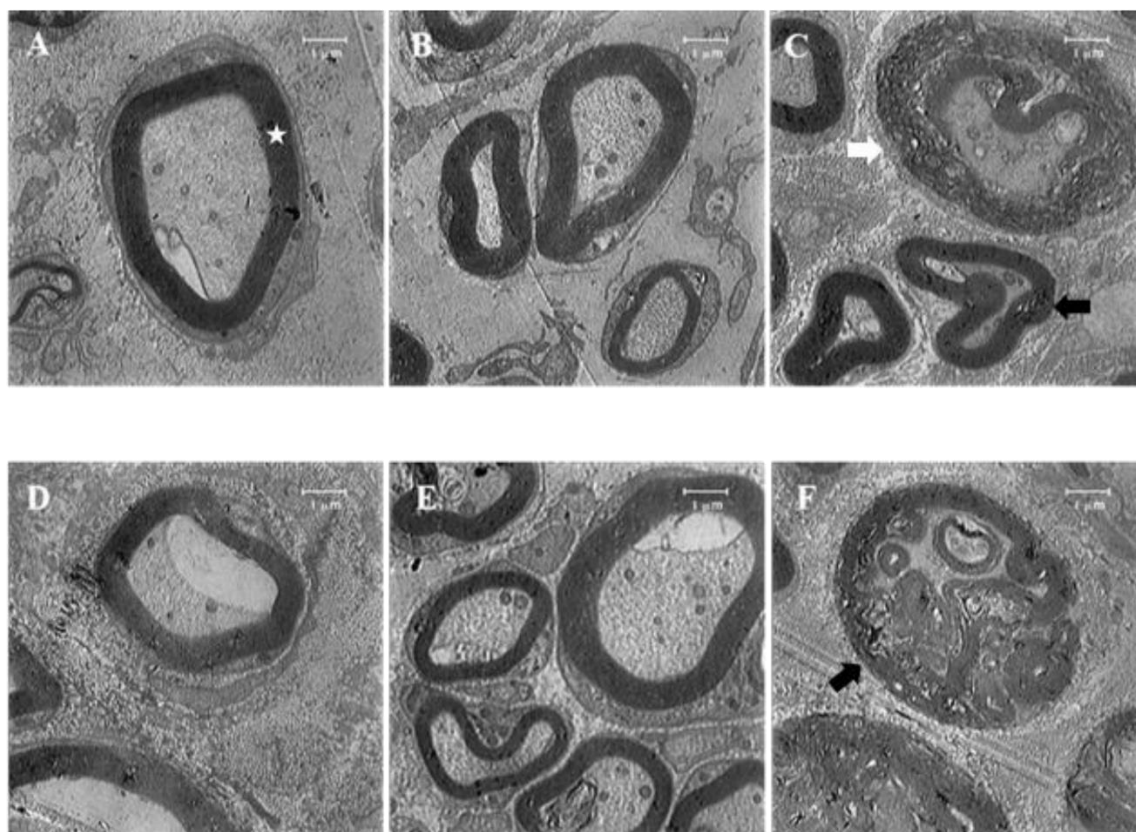
در بخش دیستال عصب گروه آتورواستاتین، ۶۰ درصد فیبرها غلاف میلین سالم داشتند؛ درحالی‌که ۲۰ درصد فیبرها تخریب میلین

درجه یک، ۸ درصد فیبرها تخریب میلین درجه دو (جداشدگی غلاف میلین)، ۸ درصد فیبرها تخریب میلین درجه سه (نمای لانه زنبوری میلین) و ۴ درصد فیبرها تخریب میلین درجه چهار (فروریختگی کلی ساختار میلین) را نشان دادند (شکل ۳).

در گروه سیتی‌کولین + آتورواستاتین، ۷۶ درصد فیبرها غلاف میلین سالم، ۱۲ درصد تخریب میلین درجه یک، ۴ درصد تخریب میلین درجه دو، ۴ درصد تخریب میلین درجه سه و ۴ درصد تخریب میلین درجه چهار را نشان دادند (شکل ۳).

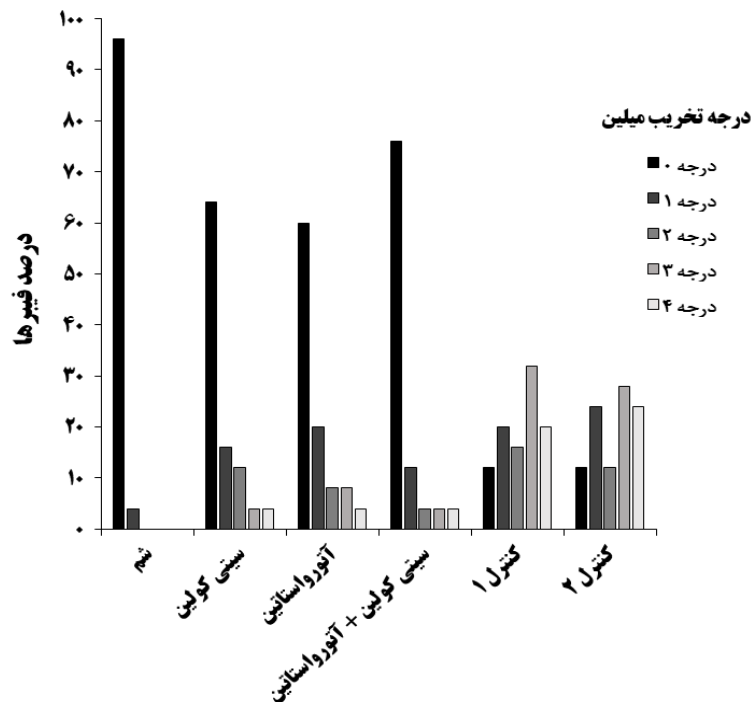
در گروه کنترل ۱، ۱۲ درصد فیبرها دارای غلاف میلین سالم، ۲۰ درصد تخریب میلین درجه یک، ۱۶ درصد تخریب میلین درجه دو، ۳۲ درصد تخریب میلین درجه ۳ و ۲۰ درصد تخریب میلین درجه چهار را نشان دادند (شکل ۳).

در گروه کنترل ۲، ۱۱ درصد فیبرها دارای غلاف میلین سالم، ۲۵ درصد تخریب میلین درجه یک، ۱۲ درصد تخریب میلین درجه دو، ۲۸ درصد تخریب میلین درجه ۳ و ۲۴ درصد تخریب میلین درجه چهار را نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۲. میکروگراف‌های الکترونی بخش دیستال عصب سیاتیک در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب.

(A) گروه شم: یک فیبر عصبی میلین‌دار با غلاف میلین طبیعی (ستاره) را نشان می‌دهد، (B) گروه سیتی‌کولین: فیبرهای میلین‌دار بزرگ با غلاف میلین طبیعی را نشان می‌دهد، (C) گروه کنترل منفی ۱ (سالین): فلش سفید یک فیبر عصبی با تخریب میلین درجه ۳ و فلش سیاه یک فیبر با تخریب میلین درجه ۱ را نشان می‌دهد، (D) گروه آتورواستاتین: فیبرهای میلین‌دار طبیعی را نشان می‌دهد، (E) گروه سیتی‌کولین + آتورواستاتین: فیبرهای میلین‌دار طبیعی را نشان می‌دهد و (F) گروه کنترل منفی ۲ (حلال آتورواستاتین): فلش سیاه یک فیبر عصبی با تخریب میلین درجه ۴ را نشان می‌دهد. مقیاس خطی ۱ μm .



شکل ۳: پراکنش فیبرهای میلین دار با درجات متفاوتی از تخریب میلین در بخش دیستال عصب سیاتیک پس از ارزیابی میکروگراف‌های الکترونی در پایان هفته ۱۴ پس از پیوند عصب. ارزیابی کمی ساختار میلین با استفاده از نوعی سیستم درجه‌بندی انجام شد که طبق این درجه‌بندی، درجه صفر برای طبیعی بودن غلاف میلین، درجه یک برای وریکول‌دار بودن غلاف میلین، درجه دو برای جداشدگی لایه‌های میلین، درجه سه برای نمای لانه زنبوری میلین و درجه چهار برای فروریختگی کلی ساختار میلین به کار برده شد.

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که در بخش دیستال عصب، قطر فیبرها، قطر آکسون‌ها، ضخامت میلین و مساحت سطح مقطع فیبر در گروه‌های سیتی کولین، آتورواستاتین و سیتی کولین + آتورواستاتین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های کنترل (حلال) بود. از آنجاکه مقایسه گرفتار تفاوت معنی‌داری را از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب نشان نداد، چنین به نظر می‌رسد که تفاوت بین دو گروه ناشی از تفاوت در ظرفیت رژنراسیون آکسونی بخش دیستال عصب باشد. افزایش قطر فیبر به تدریج در طی رشد آکسون اتفاق می‌افتد [۳۶]. وجود فیبرهای قطور در بخش دیستال عصب گروه‌های سیتی کولین، آتورواستاتین و سیتی کولین + آتورواستاتین می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که ورود آکسون‌ها به بخش دیستال عصب در این گروه‌ها زودتر از گروه‌های کنترل اتفاق افتاده است. به همین ترتیب، می‌توان گفت فیبرهای با قطر کم در گروه‌های کنترل، در واقع، فیبرهای تازه‌وارد به بخش دیستال عصب هستند. برای ورود آکسون‌ها به بخش دیستال باید لوله‌های اندونوریومی سالم باشند [۳۷]. قطع طولانی‌مدت عصب باعث می‌شود که فضای اندونوریومی دچار تغییرات ساختاری شود و از فیبریل‌های کلاژن و سلول‌های شبه‌فیبروبلاستی اندونوریومی پر شود [۳۷]. بعد از آسیب عصبی، افزایش بیان کلاژن همراه با فاکتور رشد تغییردهنده بتا ($TGF-\beta$: Transforming growth factor beta) و پروتئوگلیکان‌های کندرویتین‌سولفات در ماتریکس خارج سلولی به ایجاد فیبروز منجر می‌شود. فیبروز خارج عصبی و داخل عصبی مهم‌ترین مانع برای ورود آکسون‌های در حال رشد به بخش دیستال

عصب است [۳۸]؛ بنابراین، مخروط رشد مجبور است با ترشح آنزیم‌هایی بافت اسکار را حل کند [۳۹] که به تأخیر در ورود آکسون‌ها به بخش دیستال منجر می‌شود. این موضوع می‌تواند توضیحی برای کاهش مشاهده‌شده در قطر آکسون‌ها در گروه‌های کنترل باشد. در پژوهش حاضر، مساحت سطحی فضای داخل فاسیکولی (فضای بین فیبرهای میلین دار) در بخش دیستال عصب در سه گروه سیتی کولین، آتورواستاتین و سیتی کولین + آتورواستاتین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های کنترل بود. بالا بودن تراکم فیبرها در گروه‌های آتورواستاتین و سیتی کولین + آتورواستاتین در مقایسه با گروه کنترل ۲ می‌تواند دلیل کاهش مساحت داخل فاسیکولی در این دو گروه باشد؛ درحالی‌که در گروه سیتی کولین، نبود تفاوت در تراکم فیبرها هم‌زمان با کاهش مساحت فضای داخل فاسیکولی در مقایسه با گروه کنترل می‌تواند نشان‌دهنده کاهش فیبروز بخش دیستال عصب باشد. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که تجویز سیتی کولین مانع از تشکیل اسکار در محل آسیب عصب محیطی می‌شود [۱۴، ۱۱].

مقایسه اثرات سه تیمار دارویی سیتی کولین، آتورواستاتین و سیتی کولین + آتورواستاتین بر شاخص‌های ریخت‌سنجی بخش دیستال عصب سیاتیک نشان داد که تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب، بین دو گروه سیتی کولین و آتورواستاتین وجود ندارد. اگرچه در گروه سیتی کولین + آتورواستاتین تراکم فیبرها و مساحت داخل فاسیکولی مشابه گروه سیتی کولین بود، این گروه در مقایسه با گروه آتورواستاتین، تراکم فیبر بالاتر و مساحت داخل فاسیکولی کمتر داشت. کاهش مساحت داخل فاسیکولی در گروه

تنظیمی بر مولکول‌های سیگنالینگ داخل سلولی و فاکتورهای رونویسی دارد [۱۸]. در این رابطه، چنین به نظر می‌رسد که برخی از اثرات استاتین‌ها ناشی از مهار ایزوپرنیل‌شدن پروتئین‌های درگیر در پیام‌رسانی داخل سلولی (مانند Rho، Rac و Ras)، تکثیر و تمایز است [۴۸، ۴۷]. بر اساس گزارش‌های موجود، تجویز آتورواستاتین (۴۸/۴۷ mg/kg) ۵) قبل یا بعد از آسیب عصبی، باعث بهبود شاخص‌های عملکردی و ریخت‌شناسی عصب آسیب‌دیده می‌شود [۲۰، ۱۸]. در مجموع، لازم است به این موضوع اشاره شود که اگرچه پژوهش‌های قبلی اثرات مفید تجویز سیتی‌کولین و آتورواستاتین را بر ترمیم عصب بعد از پیوند فوری عصب نشان داده‌اند [۲۰، ۱۸، ۱۵-۱۱]، تاکنون اثرات آن‌ها بعد از تأخیر در پیوند عصب مطالعه نشده بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد که یک ماه تجویز سیتی‌کولین و آتورواستاتین قبل از پیوند عصب، به بهبود شاخص‌های ریخت‌سنجی بخش دیستال عصب سیاتیک منجر می‌شود.

دو گروه کنترل ۱ (حلال آتورواستاتین) و کنترل ۲ (سالیین) تفاوت معناداری را از لحاظ شاخص‌های ریخت‌سنجی و فراساختاری عصب نشان ندادند؛ بنابراین، می‌توان گفت که حلال آتورواستاتین اثرات مشابه با سالیین بر شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب می‌گذارد.

از آنجاکه شروع تیمارها یک ماه قبل از پیوند گرافت و شروع رژنراسیون آکسونی بود و تفاوتی بین گرافت‌ها از نظر کیفیت رژنراسیون آکسونی وجود نداشت، می‌توان نتیجه گرفت که اثرات تیمارها فقط ناشی از حفظ ظرفیت رژنراسیون آکسونی بخش دیستال عصب است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که در شرایطی که ترمیم فیبرها امکان‌پذیر نیست (تأخیر در جراحی ترمیمی)، تیمارهای دارویی سیتی‌کولین و آتورواستاتین با حفظ ساختار بخش دیستال عصب باعث تقویت رشد آکسون‌ها و ترمیم عصب بعد از پیوند عصب می‌شوند؛ علاوه بر این، کاربرد هم‌زمان دو دارو، اثر هم‌افزایی بر ترمیم عصب دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد (پژوهانه شماره ۳/۴۶۳۸۹) به‌خاطر پشتیبانی مالی از پژوهش انجام‌شده اعلام می‌کنند. همچنین، نویسندگان از همکاری صمیمانه آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد، خانم دکتر فاطمه ناصری و سرکار خانم رکسانا پسیان که در آماده‌سازی نمونه‌ها و تصویربرداری نقش داشته‌اند، تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافع با سازمان‌ها و افراد دیگر وجود ندارد.

سیتی‌کولین + آتورواستاتین احتمالاً ناشی از تراکم بالاتر فیبرها در این گروه در مقایسه با گروه آتورواستاتین است؛ علاوه بر این، ضخامت میلین در گروه سیتی‌کولین + آتورواستاتین به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه سیتی‌کولین و آتورواستاتین بود. از طرف دیگر، قطر فیبر، قطر آکسون و مساحت سطح مقطع آکسونی در هر سه تیمار دارویی مشابه بود. از آنجاکه شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب (تراکم فیبر، ضخامت میلین و مساحت فضای داخل فاسیکولی) در گروه سیتی‌کولین + آتورواستاتین بهتر از دو گروه سیتی‌کولین و آتورواستاتین است، چنین به نظر می‌رسد که دو داروی سیتی‌کولین و آتورواستاتین دارای اثرات هم‌افزایی در بهبود شاخص‌های ریخت‌سنجی عصب هستند. از آنجاکه هر دو داروی سیتی‌کولین و آتورواستاتین دارای اثرات ضدالتهابی، ضدآپوپتوزی و ضداسترس اکسیداتیو هستند [۴۰، ۱۰]، تجویز هم‌زمان دو دارو می‌تواند این اثرها را تشدید کند.

از طرف دیگر، یافته‌های حاصل از مطالعه فراساختاری عصب با استفاده از TEM نشان دادند که در گروه‌های سیتی‌کولین، آتورواستاتین و سیتی‌کولین + آتورواستاتین، اکثر فیبرها در بخش دیستال عصب غلاف میلین طبیعی دارند. تنها درصد کمی از فیبرها در این گروه دارای غلاف میلین درحالت تخریب (با درجه تخریب کم) بودند که این امر می‌تواند به فیبرهایی مربوط باشد که به اندام هدف خود نرسیده‌اند [۴۱]. سالم‌بودن غلاف میلین نشانه حمایت کافی سلول‌های شوان از آکسون‌های درحال‌رشد و نبود بافت فیبری در بخش دیستال عصب یا عضله است. گزارش‌های منتشرشده نشان می‌دهند که عوامل مختلفی در آسیب‌دیدن سلول‌های شوان نقش دارند؛ مانند سمیت ناشی از تحریک عصبی، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و پاسخ‌های التهابی [۴۳، ۴۲]. سیتی‌کولین با مهار آنزیم فسفولیپاز A2 از پراکسیداسیون لیپیدها و شروع پاسخ‌های التهابی جلوگیری می‌کند [۱۰، ۹]؛ علاوه بر این، کاربرد موضعی یا سیستمیک سیتی‌کولین، سیتیدین، کولین یا سیتیدین + کولین در موش صحرایی باعث افزایش ترمیم عصب و بهبود عملکرد پس از آسیب عصب سیاتیک می‌شود [۱۵-۱۱]. این یافته‌ها نشان می‌دهند که اثرات درمانی سیتی‌کولین ممکن است ناشی از متابولیت‌های حاصل از آن، یعنی کولین، سیتیدین یا هر دو باشد [۱۳، ۱۲]؛ همچنین، آتورواستاتین عضوی از خانواده استاتین‌ها است که اثرات حفاظت‌کنندگی عصبی در بیماری‌های تحلیل‌برنده اعصاب، مانند آلزایمر و اسکروز چندگانه دارند [۴۴، ۴۰، ۱۶]. این اثرها ناشی از فعالیت‌های ضدالتهابی [۴۵]، ضدانعقادی [۴۶]، ضدسمیت تحریکی [۱۶]، آنتی‌اکسیدانی [۲۱] و تنظیم‌کنندگی ایمنی [۴۴] استاتین‌ها است. آتورواستاتین باعث کاهش استرس اکسیداتیو [۱۹، ۱۸]، کاهش آپوپتوز [۱۸]، مهار فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز [۲۲، ۱۸]، کاهش التهاب [۲۳، ۲۲، ۱۸] و کاهش نفوذپذیری سد خونی عصبی [۱۸] در اعصاب محیطی آسیب‌دیده می‌شود. آتورواستاتین همچنین، اثر

References

- Romeo-Guitart D, Casas C. Network-centric medicine for peripheral nerve injury: treating the whole to boost endogenous mechanisms of neuroprotection and regeneration. *Neural Regen Res*. 2019;**14**(7):1122-1128. DOI: 10.4103/1673-5374.251187 PMID: 30804234
- Saadat S, Eslami V, Rahimi-Movaghar V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2011;**17**(6):539-544. DOI: 10.5505/tjtes.2011.75735 PMID: 22290008
- Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle Nerve*. 2006;**34**(6):785-788. DOI: 10.1002/mus.20624 PMID: 16881066
- Jonsson S, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, et al. Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery. *PLoS One*. 2013;**8**(2):e56484. DOI: 10.1371/journal.pone.0056484 PMID: 23409189
- Grieb P. Neuroprotective properties of citicoline: facts, doubts and unresolved issues. *CNS Drugs*. 2014;**28**(3):185-193. DOI: 10.1007/s40263-014-0144-8 PMID: 24504829
- Park CH, Kim YS, Noh HS, Cheon EW, Yang YA, Yoo JM, et al. Neuroprotective effect of citicoline against KA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Exp Eye Res*. 2005;**81**(3):350-358. DOI: 10.1016/j.exer.2005.02.007 PMID: 16129102
- Parisi V, Coppola G, Centofanti M, Oddone F, Angrisani AM, Ziccardi L, et al. Evidence of the neuroprotective role of citicoline in glaucoma patients. *Prog Brain Res*. 2008;**173**:541-554. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)01137-0 PMID: 18929133
- Cacabelos R, Caamaño J, Gómez MJ, Fernández-Novoa L, Franco-Maside A, Alvarez XA. Therapeutic effects of CDP-choline in Alzheimer's disease. Cognition, brain mapping, cerebrovascular hemodynamics, and immune factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;**777**:399-403. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb34452.x PMID: 8624120
- Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A₂ stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2003;**73**(3):308-315. DOI: 10.1002/jnr.10672 PMID: 12868064
- Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2002;**70**(2):133-139. DOI: 10.1002/jnr.10403 PMID: 12271462
- Özay R, Bekar A, Kocaeli H, Karlı N, Filiz G, Ulus IH. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg Neurol*. 2007;**68**(6):615-622. DOI: 10.1016/j.surneu.2006.12.054 PMID: 18053855
- Aslan E, Kocaeli H, Bekar A, Tolunay S, Ulus IH. CDP-choline and its endogenous metabolites, cytidine and choline, promote the nerve regeneration and improve the functional recovery of injured ratsciatic nerves. *Neurol Res*. 2011;**33**(7):766-773. DOI: 10.1179/1743132811Y.0000000004 PMID: 21756558
- Caner B, Kafa MI, Bekar A, Kurt MA, Karlı N, Cansev M, et al. Intraperitoneal administration of CDP-choline or a combination of cytidine plus choline improves nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Neurol Res*. 2012;**34**(3):238-245. DOI: 10.1179/1743132812Y.0000000003 PMID: 22449436
- Liu L, Nie Z, Han H, Song Q, Jia X, Lian T, et al. Role of Citicoline in promoting the repair of acute peripheral nerve injury in rat models. *Neurosci Biomed Eng*. 2016;**4**(4):237-240. DOI: 10.2174/2213385205666170113161712
- Emril DR, Wibowo S, Meliala L, Susilowati R. Cytidine 5'-diphosphocholine administration prevents peripheral neuropathic pain after sciatic nerve crush injury in rats. *J Pain Res*. 2016;**9**:287-291. DOI: 10.2147/JPR.S70481 PMID: 27284264
- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*. 2005;**92**(6):1386-1398. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02980.x PMID: 15748157
- Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol*. 1988;**62**(15):10-15. DOI: 10.1016/0002-9149(88)90002-1 PMID: 3055919
- Pan HC, Yang DY, Ou YC, Ho SP, Cheng FC, Chen CJ. Neuroprotective effect of atorvastatin in an experimental model of nerve crush injury. *Neurosurgery*. 2010;**67**(2):376-388. DOI: 10.1227/01.NEU.0000371729.47895.A0 PMID: 20539249
- Vakharia KT, Lindsay RW, Knox C, Edwards C, Henstrom D, Weinberg J, et al. The effects of potential neuroprotective agents on rat facial function recovery following facial nerve injury. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;**144**(1):53-59. DOI: 10.1177/0194599810390892 PMID: 21493387
- Cloutier FC, Rouleau DM, Hébert-Davies J, Beaumont PH, Beaumont E. Atorvastatin is beneficial for muscle reinnervation after complete sciatic nerve section in rats. *J Plast Surg Hand Surg*. 2013;**47**(6):446-450. DOI: 10.3109/2000656X.2013.778205 PMID: 23848426
- Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N, More AS, et al. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. *Neurochem Int*. 2014;**68**:1-9. DOI: 10.1016/j.neuint.2014.01.014
- Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, More AS, Kant V, Kumar D, et al. Antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Inflammation*. 2013;**36**(6):1468-1478. DOI: 10.1007/s10753-013-9688-x PMID: 23872719
- Chu LW, Chen JY, Yu KL, Cheng KI, Wu PC, Wu BN. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of atorvastatin in a rat chronic constriction injury model. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;**25**(1):219-230. DOI: 10.1177/039463201202500124 PMID: 22507334
- Kaplan T, Kafa IM, Cansev M, Bekar A, Karlı N, Taskapilioglu MO, et al. Investigation of the dose-dependency of citicoline effects on nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg*. 2014;**24**(1):54-62. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.8451-13.0 PMID: 24535792
- Stenberg L, Stöbel M, Ronchi G, Geuna S, Yin Y, Mommert S, et al. Regeneration of long-distance peripheral nerve defects after delayed reconstruction in healthy and diabetic rats is supported by immunomodulatory chitosan nerve guides. *BMC Neurosci*. 2017;**18**(1):53. DOI: 10.1186/s12868-017-0374-z PMID: 28720074
- Citak MS, Cué JI, Peyton JC, Malangoni MA. The critical relationship of antibiotic dose and bacterial contamination in experimental infection. *J Surg Res*. 1992;**52**(2):127-130. DOI: 10.1016/0022-4804(92)90292-8 PMID: 1740934
- Livingston DH, Wang MT. Continuous infusion of cefazolin is superior to intermittent dosing in decreasing infection after hemorrhagic shock. *Am J Surg*. 1993;**165**(2):203-207. DOI: 10.1016/S0002-9610(05)80507-0 PMID: 8427396
- Nunamaker EA, Goldman JL, Adams CR, Fortman JD. Evaluation of analgesic efficacy of meloxicam and 2 formulations of buprenorphine after laparotomy in female Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2018;**57**(5):498-507. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-17-000129 PMID: 30092855
- Dykstra MJ. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. Plenum Press, New York; 1992.
- Moharrami-Kasmaie FM, Jahromi Z, Gazor R, Zaminy A. Comparison of melatonin and curcumin effect at the light and dark periods on regeneration of sciatic nerve crush injury in rats. *EXCLI J*. 2019;**18**:653-665. DOI: 10.17179/excli2019-1369 PMID: 31611748
- Duval T, Saliiani A, Nami H, Nanci A, Stikov N, Leblond H, et al.

- Axons morphometry in the human spinal cord. *Neuroimage*. 2019;**185**:119-128. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.033 PMID: 30326296
32. Sakita M, Murakami S, Fujino H, Hayashi S, Kameyama K, Saito T, et al. Remodeling of myelinated fibers and internal capillaries in distal peripheral nerves following aerobic exercise in aged rats. *J Appl Physiol*. 2018;**125**:1051-1061. DOI: 10.1152/japplphysiol.00257.2018 PMID: 30024334
 33. Sevik L, Vayisoğlu Y, Korlu S, Çömelekoğlu Ü, Arpacı RB, Aktaş S, et al. The effects of methylprednisolone and vitamin A on the healing of traumatic peripheral nerve paralysis. *Int Adv Otol*. 2014;**10**(3):275-280.
 34. Saito H, Dahlin LB. Expression of ATF3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci*. 2008;**9**:88. DOI: 10.1186/1471-2202-9-88 PMID: 18801180
 35. Howell DC, Fundamental statistics for the behavioral sciences. Cengage Learning, Boston; 2014.
 36. Xu C, Kou Y, Zhang P, Han N, Yin X, Deng J, et al. Electrical stimulation promotes regeneration of defective peripheral nerves after delayed repair intervals lasting under one month. *PLoS One*. 2014;**9**(9):e105045. DOI: 10.1371/journal.pone.0105045 PMID: 25181499
 37. Røytte M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. *Acta Neuropathol*. 1988;**76**:35-45. DOI: 10.1007/BF00687678 PMID: 3394492
 38. Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res*. 2019;**60**(1):3-9. DOI: 10.1080/03008207.2018.1489381 PMID: 30187777
 39. Santiago-Medina M, Gregus KA, Nichol RH, O'Toole SM, Gomez TM. Regulation of ECM degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. *Development*. 2015;**142**(3):486-496. DOI: 10.1242/dev.108266 PMID: 25564649
 40. Barone E, Cenini G, Di Domenico F, Martin S, Sultana R, Mancuso C, et al. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacol Res*. 2011;**63**(3):172-180. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.12.007 PMID: 21193043
 41. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav*. 2012;**2**(4):382-390. DOI: 10.1002/brb3.61 PMID: 22950042
 42. Gandolfi S, Marchini G, Caporossi A, Scuderi G, Tomasso L, Brunoro A. Cytidine 5'-diphosphocholine (citicoline): Evidence for a neuroprotective role in glaucoma. *Nutrients*. 2020;**12**(3):793. DOI: 10.3390/nu12030793 PMID: 32197303
 43. Swiderski K, Azari MF, Prokyris C, Petratos S. Molecular mechanisms in Schwann cell survival and death during peripheral nerve development, injury and disease. *Neurotox Res*. 2005;**7**(1-2):151-167. DOI: 10.1007/BF03033784 PMID: 15639806
 44. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*. 2006;**6**(5):358-370. DOI: 10.1038/nri1839 PMID: 16639429
 45. Chu LW, Chen JY, Wu PC, Wu BN. Atorvastatin prevents neuroinflammation in chronic constriction injury rats through nuclear NFκB downregulation in the dorsal root ganglion and spinal cord. *ACS Chem Neurosci*. 2015;**6**(6):889-898. DOI: 10.1021/acscchemneuro.5b00032 PMID: 25874913
 46. Wang S, Lee SR, Guo SZ, Kim WJ, Montaner J, Wang X, et al. Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. *Stroke*. 2006;**37**(7):1910-1912. DOI: 10.1161/01.STR.0000226923.48905.39 PMID: 16741180
 47. Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest*. 2002;**110**(3):285-288. DOI: 10.1172/JCI16421 PMID: 12163444
 48. Ostrowski SM, Johnson K, Siefert M, Shank S, Sironi L, Wolozin B, et al. Simvastatin inhibits protein isoprenylation in the brain. *Neuroscience*. 2016;**329**:264-274. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.053 PMID: 27180285