

А.Л. БОБРОВ¹, О.М. БОРИСЕНКО¹, Т.А. МАЛИШЕВА²,
А.Є. ПЕДАЧЕНКО¹, О.В. ПАПП

МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ТРИВАЛОЇ ПРЯМОЇ ЕЛЕКТРОСТИМУЛЯЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ СИСТЕМИ НА ДЕНЕРВОВАНИЙ КРУГОВИЙ М'ЯЗ ОКА ПРИ ОДНОБІЧНОМУ УРАЖЕННІ ЛИЦЕВОГО НЕРВА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

¹Державна установа “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка
Національної академії медичних наук України”
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний);

²Державна установа “Інститут нейрохірургії імені А.П. Ромоданова
Національної академії медичних наук України”
(дир. – акад. НАМН України, проф. Є.Г. Педаченко)

У великій кількості літературних джерел автори відмічають ефективність застосування функціональної електростимуляції (ФЕС) після хірургічних втручань для досягнення повного м'язового скорочення та попередження атрофії у денервованих мімічних м'язах чи денервованих м'язах кінцівок [4-6, 22]. Таким чином з'являється альтернативна можливість заплучення повік шляхом прямої електричної стимуляції повністю чи частково денервованого кругового м'яза ока (КМО) для посилення скорочення при частковій реіннервації після нейрооррафії.

Деякі автори звертають увагу на можливість повного заплучення очної щілини при однобічному ураженні лицевого нерва (ЛН) шляхом прямої електростимуляції у експерименті на тваринах [13, 14, 16-18, 20, 21], а також позитивний вплив електростимуляції денервованого КМО на його реіннервацію [24]. Було проведено оцінку деяких типів стимуляції й двох типів електродів під час стимуляції зовнішніми стимуляторами [13, 14, 16-18, 20, 21].

Однак вплив прямої електростимуляції на структуру м'яза вивчені недостатньо. У нашій роботі була проведена морфологічна оцінка впливу на денервований КМО після 30 діб прямої електростимуляції. Ці результати будуть сприяти специфікації вимог до пристроїв, що імплантуються хро-

нічно для відновлення функції заплучення повік.

Матеріали та методи

В експерименті на 12 статевозрілих тваринах була створена модель однобічного ураження ЛН з послідовним паралічем КМО у всіх тварин. Тварини були розподілені на 2 групи: основна і контрольна. У основній тваринам проводилась імплантація стимулюючої частини біоелектричного пристрою для закриття ока по типу зворотного зв'язку, після чого було перевірено можливість роботи в режимі реального часу для виконання довготривалої стимуляції денервованого кругового м'яза ока. У контрольній групі тварини не отримували жодного впливу на КМО. Через 30 діб у всіх тварин було проведено видалення КМО на боці паралічу ЛН з наступним морфологічним дослідженням.

Електронно-мікроскопічне дослідження проводилось за загально прийнятими стандартами: фрагменти тканини розміром 1 мм³, забиралися одразу після забою дослідних тварин, фіксували в суміші 4% парформальдегіду, 2,5% глютаральдегіду і 4% сахарози на 0,1 молярному фосфатному буфері рН=7,4 з наступною дофіксацією в 1% розчині чотирьохокису осмію, зневоднювали у зростаючих концентраціях етанолу і оксіпропілену і заливалися в суміш

епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками електронної мікроскопії. Ультратонкі зрізи товщиною 60-70 нм виготовлялись на ультратомах LKB [Швеція] і Reicherdt-Jung [Австрія]. Для підвищення контрасту забарвлювали за Reynolds [1963] і оцінювались під електронним мікроскопом EM-400T фірми "PHILIPS" [Нідерланди]. Ідентифікація процесів, що спостерігалась в м'язових волокнах дослідних тварин (n=6 в кожній групі дослідження), проводилась за допомогою морфометричної обробки поперечних серійних зрізів на комп'ютерному аналізаторі зображень CAI-01ABH фірми «SELMI» (Україна) з використанням програмного забезпечення «Karpa optoelectronics GmbH» (Німеччина) в 10 довільно взятих полях зору при однаковому збільшенні (x 800).

Оцінювалась: питома площа м'язових волокон (у відсотках) та площа, зайнята м'язовою тканиною, до площі всього поперечного зрізу м'яза; співвідношення площ, зайнятих компонентами сполучної та м'язової тканини у площині поперечного зрізу м'яза.

На електронно-мікроскопічному рівні при однаковому збільшенні x22000 підраховувалась:

питома площа міофібрил, виражена у відсотках, яка визначалась як відношення площі, зайнятої міофібрилами, до площі поперечного зрізу саркоплазми міоцитів;

питома площа мітохондрій, виражену у відсотках, яка визначалась як відношення площі, зайнятої мітохондріями, до площі поперечного зрізу саркоплазми міоцитів;

проліферативна активність клітин у досліді порівняно з контролем (індекс Кі-67): визначення співвідношення кількості позитивно забарвлених клітин до загальної кількості клітин в полі зору (ядерна експресія).

Нормальність розподілу даних перевірялась за критерієм Шапіро-Уїлкі. Оскільки розподіл даних не відповідав показникам нормального розподілу, для статистичної обробки отриманих даних застосовувався непараметричний критерій Манна-Уїтні щодо порівняння груп (дослід/контроль). Статистичний аналіз та графічне представлення результатів виконувалось з викорис-

танням пакета програм STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>). Відмінності вважались статистично значущими при $p < 0,05$.

Усереднені величини представлялись у вигляді М (25%; 75%) (n), де М – медіана; (.) – інтерквартильний діапазон.

Дисекція і пересічення ЛН

Перед хірургічним втручанням тваринам проводилась анестезія за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції кетаміну (50-80 мг/кг) і ксилазину (5-10 мг/кг). Проведено розріз в ділянці між нижньою щелепою тварини і основою вушної раковини, ідентифікували ЛН та його гілки, що було підтверджено за допомогою стимуляції на моніторі ЛН (Neurosign). Далі було виконано повне пересічення основного стовбуру ЛН з його перев'язкою для попередження можливої реіннервації. Після цього виконувались розрізи шкіри на верхній повіці з двох сторін для підшкірної імплантації пелюсткових електродів з метою виконання стимуляції на стороні паралічу і реєстрації ЕМГ-сигналу на здоровому боці. Електроди підшивались до оточуючих тканин у підшкірному просторі, рана була закрита 4-0 викрилом вузловими швами. Тварини отримували в/м антибіотикотерапію (пеніцилін 150000) на протязі 3 діб. На протязі всього послідовного періоду стимуляції виконувалась перевірка мигального рефлексу з двох сторін з метою перевірки порушення іннервації КМО.

Протокол електричної стимуляції

В ході проведення хронічного експерименту були досліджені моторні відповіді КМО дослідних тварин на електричну стимуляцію біфазними імпульсами струму. Стимуляційні параметри варіювали по частоті (від 40 до 50 Гц), амплітуді сили струму (від 1 до 7 мА) і ширині імпульсу (від 100 до 400 мкс). Перед безпосереднім проведенням вимірювання було визначено, що результати не залежать від порядку проходження стимуляційних параметрів (послідовності вимірювання значень частот и тривалості імпульсу у прямому, інверсному або випадковому порядку).

Кожна тварина спостерігалась на протязі 30 діб. Після проведення операції трансекції і імплантації електродів тварини відновлювались на протязі 3 діб для заживлення і зниження набряку тканин. На протязі послідовних 4 діб (4-7-а доба після імплантації) тварини отримували курс електростимуляції на протязі 20 хвилин кожної доби без реєстрації виникаючих моторних відповідей. Даний режим можна назвати «тренувальним», так як він сприяє адаптації тварини до проведення експерименту, а також первинній адаптації м'яза до прямої електричної стимуляції.

Починаючи з 8-ї післяопераційної доби для кожної тварини проводилась двогодинна стимуляція і вимірювались значення порогової сили струму для тривалості імпульса 100; 200; 300 та 400 мкс і частот 40; 42; 44; 46; 48 та 50 Гц. Під поняттям порогового струму (Threshold Stimulation Current, TSC) приймається мінімальне значення сили струму, при стимуляції яким досягається повне закриття очної щілини. Перевищення порогового значення також призводило до закриття ока, але могло супроводжуватись дискомфортом із-за появи больових відчуттів у тварини. Експериментальним шляхом було встановлено, що стимуляція з паузою між пачками стимуляційних імпульсів струму менш 6 секунд призводить до деградації моторної відповіді КМО, в зв'язку з чим пауза між впливами була обрана 7 секунд.

Після проведення протоколу стимуляції кролів умиротворяли внутрішньосерцевою ін'єкцією Pentobarbital (120 мг/кг), потім брались зразки тканин із верхньої і нижньої повік з обох сторін для проведення гістологічних досліджень.

Результати

Хірургічне втручання

Ідентифікація ЛН, а також імплантація міостимулятора з електродами не складна хірургічна процедура, що легко відтворюється. Ідентифікація нерву проводилась у всіх випадках за допомогою монітора ЛН (Medtronic NIM3) і стимулятора. Місце розміщення електродів не створювало суттєвого впливу на повне закриття ока. В подальшому контроль функції ЛН виконувався за

допомогою реєстрації відсутності мигального рефлексу на боці ураження кожні 7 діб від початку експерименту. У всіх 12 дослідних тварин всі етапи хірургічного втручання були успішно реалізовані.

Результати морфологічних досліджень

М'язи характеризується високим рівнем диференціації структурно-функціональних одиниць і, насамперед, самих м'язових волокон, регенерація яких може відбуватись в основному на клітинному рівні.

Травматичне ушкодження та порушення регуляції тканинного обміну призводить до атрофії та заміщення сполучною і жировою тканинами (рис.1 а-б). Ці зміни відбуваються на фоні явищ димієлінізації, спричиненої пересіченням лицевого нерву (рис. 2 а-б). На 3-й тиждень після денервації відмічались явища заміщення м'язевих волокон сполучно-тканинним рубцем з активними зонами ангіоматозу та активацією фібробластів та гістіоцитів (рис. 3 а-г). Окрім того, спостерігалась різниця у співвідношенні сполучної тканини та залишків м'язових волокон (рис. 4 а-б). Водночас навколо високо диференційованих м'язових волокон локалізуються клітинисателіти, здатні забезпечувати відновний процес, ефективність якого визначається низкою факторів (порушення метаболізму, ішемія).

Отримані дані гістологічного дослідження показали зміни структурної організації м'язових волокон і структурних елементів системи мікроциркуляторного русла (МЦР) тривало денервованих м'язів. Насамперед встановлено порушення поперечної посмугованості волокон та їх морфометричних параметрів, що свідчить про високий рівень деструкції скоротливих елементів та їх протеоліз. Вздовж структурно змінених м'язових волокон відзначено зменшення кількості ядер (міоядер і, зокрема, клітин-сателітів), а на ультраструктурному рівні – каріопікноз міоядер (рис. 2а). Однак відзначено часткове збереження скоротливих міофібрил, що організовувались у саркомери, залежно від термінів денервації м'язів.

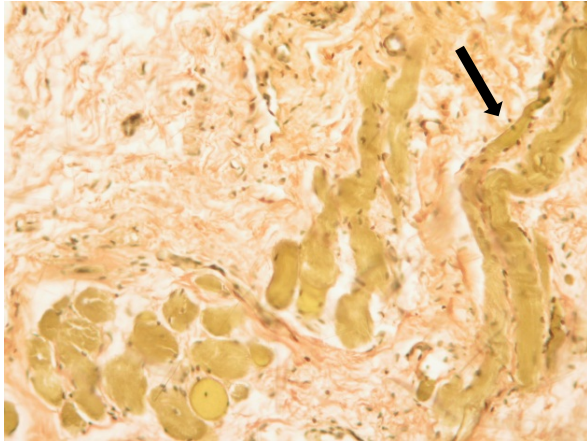


Рис. 1а. Контроль. Хід м'язових волокон (стрілка) та пухка сполучна тканина. Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином, x125.

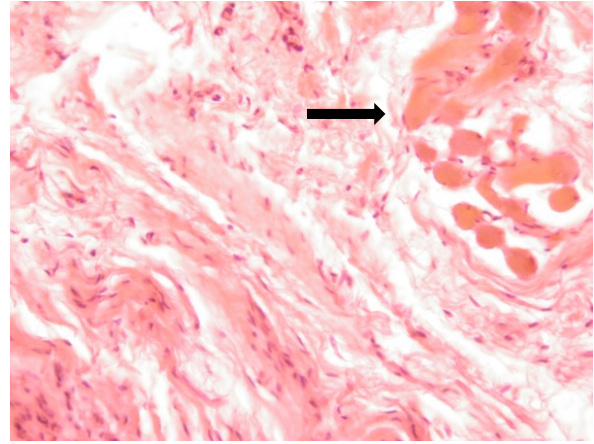


Рис. 1б. Дослід (1 міс. спостереження). Дистрофічні зміни м'язового пласта. Фіброзні зміни волокон строми із зонами ангіоматозу (стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином, x125.

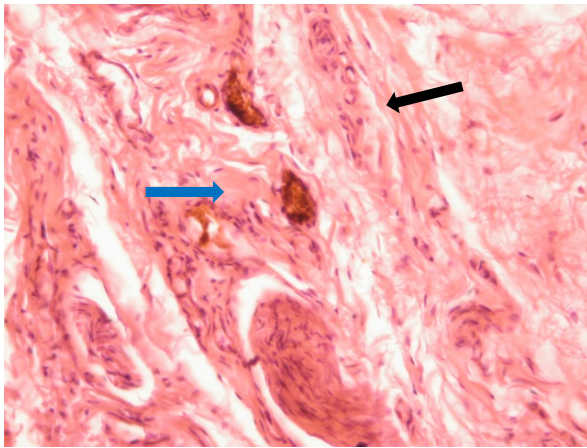


Рис. 2а. Дослід (1 міс. спостереження). набряк тканини, порушення мікроциркуляції (синя стрілка). Дистрофічні зміни нервових стовбурів. Фіброзні зміни волокон строми (чорна стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином, x125.

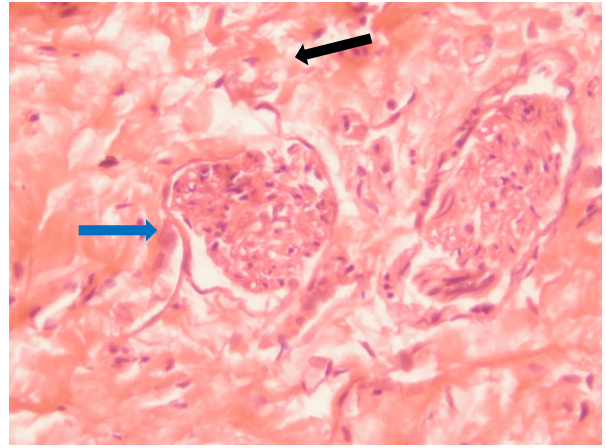


Рис. 2б. Дослід (1 міс. спостереження). набряк тканини. Фокальна демієлінізація нервових стовбурів (синя стрілка). Фіброзні зміни (грубо виражені) (чорна стрілка) волокон строми. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x125.

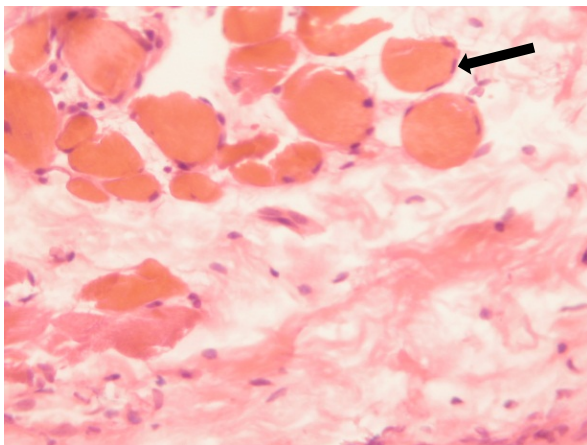


Рис. 3а. Дослід (1 міс. спостереження). Дистрофічно змінені м'язові волокна (чорна стрілка) та сполучна тканина з гіалінозом волокон. Активація стромальних фібробластів. Забарвлення гематоксиліном та еозином, x200.

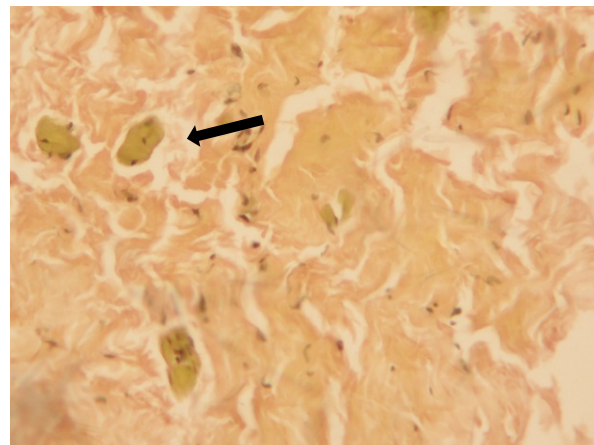


Рис. 3б. Дослід (1 міс. спостереження). Поодинокі дистрофічно змінені м'язові волокна (чорна стрілка) та сполучна тканина з гіалінозом волокон. Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином, x200.

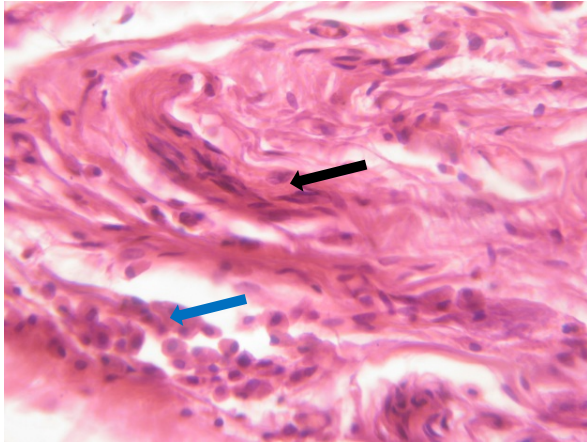


Рис 3в. Дослід (1 міс. спостереження). Формування сполучнотканинного рубця із зонами ангіоматозу (чорна стрілка). Поліморфноклітинна лейкоцитарна інфільтрація (синя стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$.

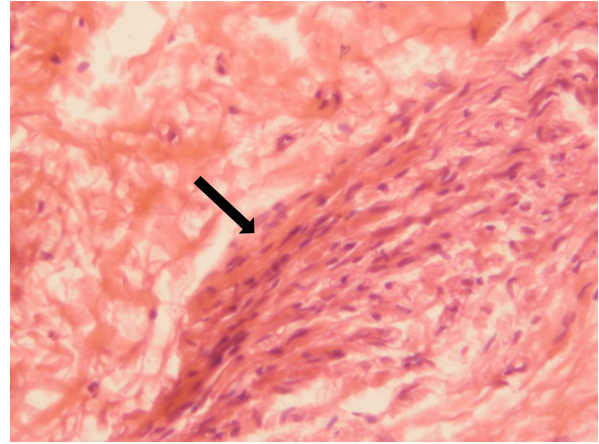


Рис. 3г. Дослід (1 міс. спостереження). Формування сполучнотканинного рубця із активацією гістіоцитів і фібробластів (чорна стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$.

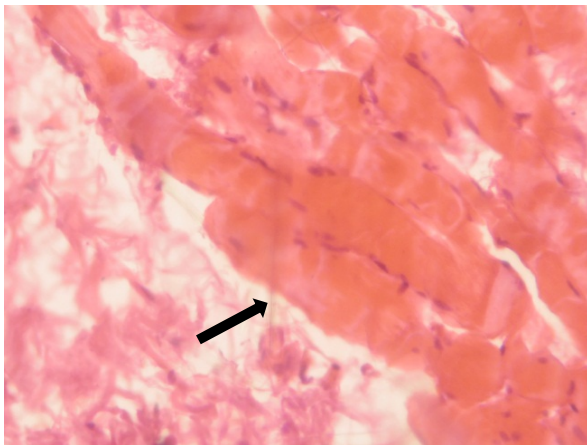


Рис 4а. Дослід (1 міс. спостереження). Набряк тканини, дистрофія м'язових волокон (чорна стрілка). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $400 \times$.

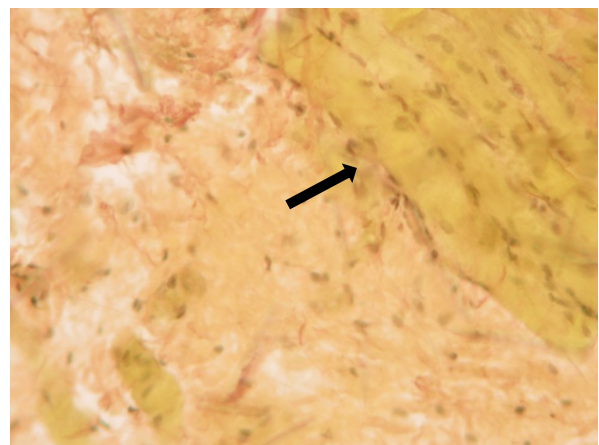


Рис 4б. Дослід (1 міс. спостереження). Заміщення сполучною тканиною частини м'язових волокон (порушення симпласту) (чорна стрілка) та сполучна тканина з гіалінозом волокон. Активація стромальних клітин. Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином, $400 \times$.

Різке подовження саркомерів у досліджуваних зразках є результатом порушення енергетичного обміну, тобто дефіциту АТФ для їх скорочення. Навколо м'язових волокон спостерігаємо збільшення інтерстиційного простору, дезорганізацію стромальних елементів перимізію, особливо на поперечному зрізі досліджуваних м'язів.

При дослідженні швидкості відновлення – проліферації міоцитів отримано такі результати. За даними міжгрупового порівняльного аналізу зміни індексу проліферації Ki-67 із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні наявна статистич-

но значуща різниця між контрольною групою та дослідною групою, що піддавалася впливу електростимуляції ($p=0,04$) з підвищенням цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 28,3 (25,0; 30,8) до 30,9 (28,8; 33,3), тобто в 1,1 раз (рис. 5)

При електронно-мікроскопічному дослідженні біоптату тканини м'язу дослідної тварини виявлено суттєве розростання щільної сполучної тканини, що містить колагенові волокна, представлені колагеном III типу, невелику кількість клітинних елементів, передусім, фібробластів і нечислен-

ні капіляри (рис. 6 а, б). Мікросудини, розташовані в ділянці сполучно-тканинного розростання, мають ендотеліальну електронно-щільну вистилку. Ендотеліоцити містять овальне ядро і велику кількість цитоплазматичних везикул. На люмінальній поверхні базальної мембрани цитоплазматичні відростки не виразні. Базальна мембрана розволокнена і містить відростки перицитів. Довколосудинний простір заповнений потужними колагеновими волокнами суцільним масивом (без просвітів).

При дослідженні матеріалу біопсії м'язів дослідних тварин виражених порушень з боку будови м'язових волокон виявлено не було. При цьому міофібрили містили виражені смуги Н із М-лініями та Z-лінії, що виглядали розмитими (рис. 7 а, б).

В дослідних препаратах відмічалось набухання міжміофібрилярного простору, помірне набухання і розволокнення міофібрил. Саркоплазматичний ретикулум (СР) містив каналці і порівняно невеликі термінальні цистерни. Ультраструктурні зміни СР характеризувалися розширенням його елементів з утворенням невеликих вакуоль. Чисельні мітохондрії мали великі розміри – були набряклими, з електронно-прозорим вмістом, помірним або значним набуханням, подекуди із втратою крист і набуванням кільцеподібної форми (рис. 7а). Відмічено скупчення мітохондрій в периферич-

них відділах м'язових волокон, на відміну від групи порівняння (рис. 7б).

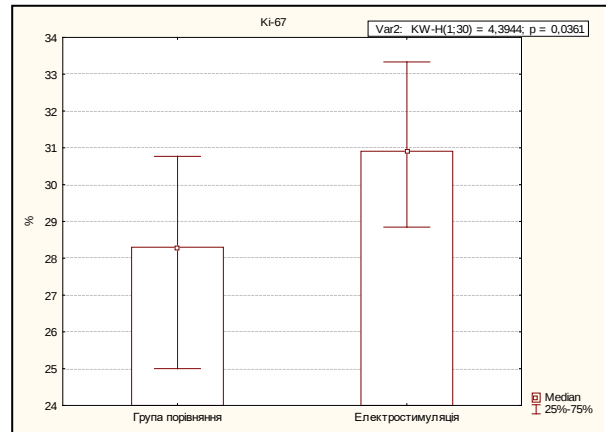


Рис. 5. Показники проліферативної активності – ядерна імуногістохімічна експресія на 100 ядер (за індексом проліферації Ki-67).

Для оцінки ступеня вираженості дистрофічно-дегенеративних і компенсаторно-приспосувальних змін нами було оцінено кількісні показники міосипласту (% на площу периферичного зрізу). Для об'єктивізації ступеня вираженості набряку тканини оцінювали питому площу, зайняту міофібрилами в міосипласті із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні порівняння показників між двома групами (рис. 8 а-б).

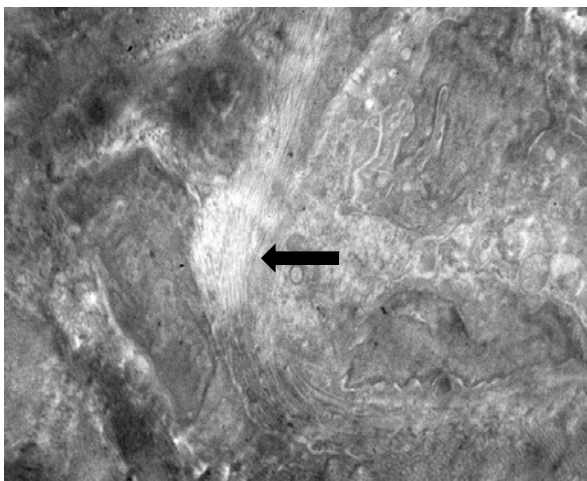


Рис. 6а. Група порівняння – фібробласти на тлі кільцеподібних розростань пучків колагенових волокон (гіперпластично змінених) (стрілка) в міжклітинному просторі. Електронна мікрофотографія. Збільшення: x6000.

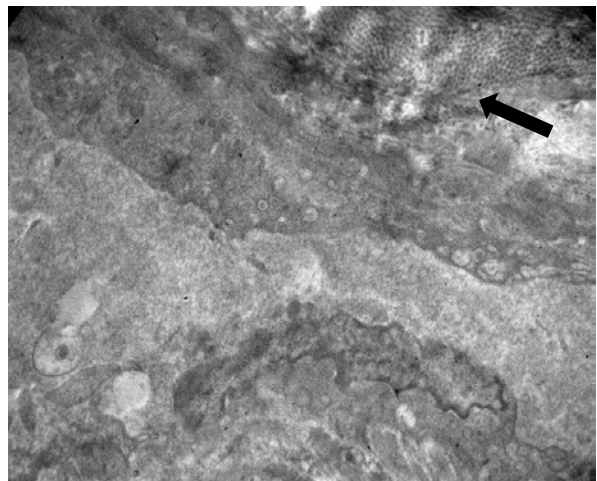


Рис. 6б. Експериментальна група – мікросудина, щільно розміщені колагенові волокна (стрілка) в навколосудинному просторі. Електронна мікрофотографія. Збільшення: x6000.

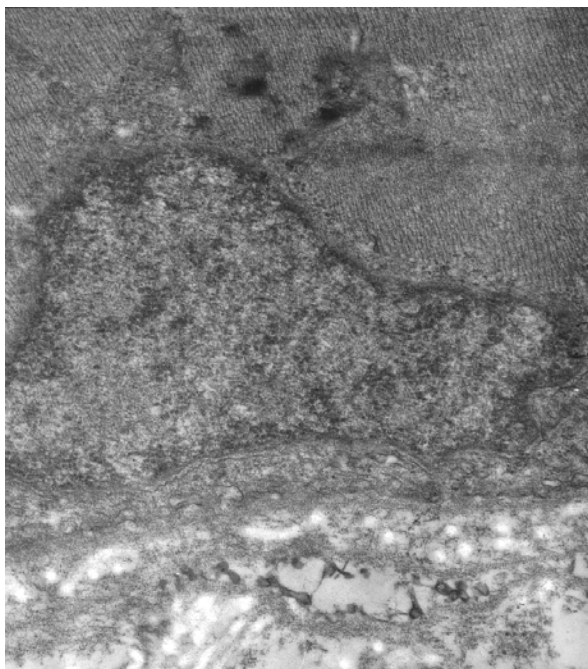


Рис. 7а. Група порівняння. М'язове волокно. Характерна цитоархітектоніка м'язового волокна: компактне спрямоване міофібрил; помірно виражена фрагментація крист мітохондрій, набряк саркоплазматичного ретикулума. Електронні мікрофотографії. Збільшення x22000.



Рис. 7б. Дослідна група. М'язове волокно. Б – порушення цитоархітектоніки м'язової тканини (помірно виражене): набухання і розволокнення міофібрил; фрагментація мітохондріальних крист, набухання саркоплазматичного ретикулума. Електронні мікрофотографії. Збільшення x22000.

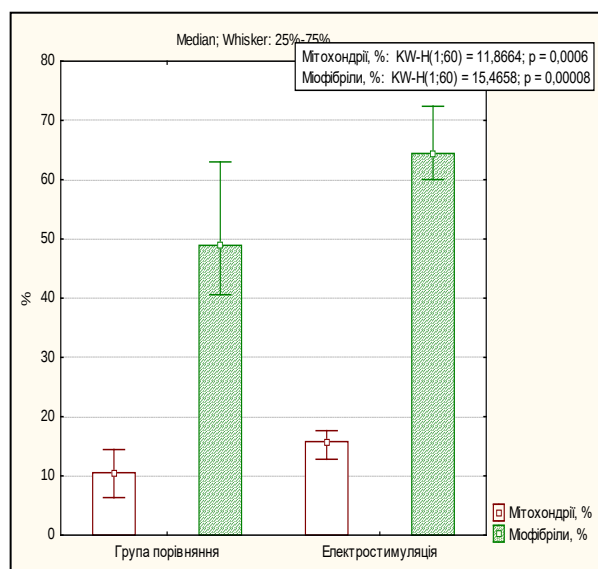


Рис. 8а. Зміни питомої площі ультраструктурних органел (мітохондрій та міофібрил) в м'ясоімпланти.

За даними міжгрупового порівняльного аналізу зміни питомої площі мітохондрій із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні наявна статистично значуща різниця між групою порівняння та

експериментальною групою, що піддавалася впливу електростимуляції ($p=0,0004$) з підвищенням цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 10,5 (6,3; 14,4) до 15,8 (12,8; 17,6), тобто в 1,5 рази.

При порівняльному аналізі зміни питомої площі міофібрил із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні також спостерігалася статистично значуще підвищення цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 48,9 (40,6; 63,0) до 64,4 (60,0; 72,4), тобто в 1,3 рази ($p=0,00005$).

При статистичному аналізі зміни питомої площі м'язів із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні спостерігалася статистично значуще підвищення цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 54,1 (50,7; 63,2) до 64,9 (59,2; 71,1), тобто в 1,2 рази ($p=0,00002$).

При статистичному аналізі зміни співвідношення площ, зайнятих компонентами сполучної та м'язової тканини у пло-

щині поперечного зрізу м'язу, із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні спостерігалось статистично значуще зниження цього показника для

групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 0,48 (0,26; 0,58) до 0,25 (0,16; 0,35), тобто в 1,9 рази ($p=0,00002$).

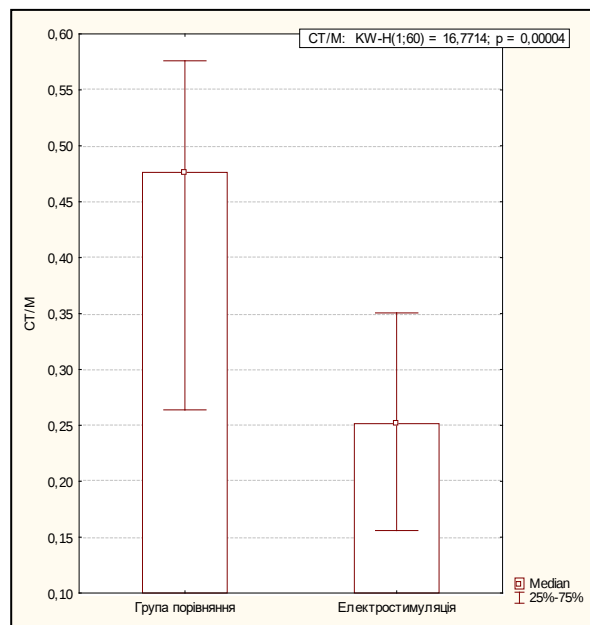
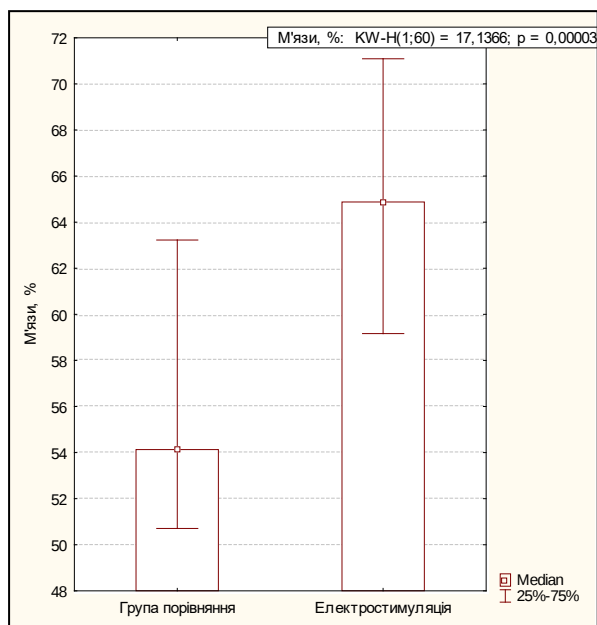


Рис. 86. Зміни питомої площі ультраструктурних органел (мітохондрій та міофібрил) в міосимпласті.

Обговорення

Враховуючи наявність літературних даних про позитивний вплив терапевтичної електростимуляції, синхронної з природними рухами, на функціональне відновлення після процедур нейрорафій [5], а також велику кількість клінічних праць, в яких автори відмічають позитивний вплив ТЕС на функціональне відновлення функції ЛН у пацієнтів, а також отримані нами дані про позитивні зміни в денервованому м'язі під впливом прямої електростимуляції виникає можливість використання представленої методики у клінічній практиці.

Іншим значущим аспектом, на нашу думку, є аберрантна кінцева реіннервація, що може пояснити нерівномірне залучення волокон у м'язі під час збудження, і як наслідок – продукування неефективних рухів

[2, 11, 12, 19]. Хронічне застосування ЕС в таких випадках приведе до синхронізації збудження в м'язі і підсиленню рухів при частковій або аберрантній реіннервації м'язу. Крім цього, під впливом ЕС денервованих м'язів відбувається зменшення утворення патологічних варіантів реіннервації [24].

Також слід відмітити, що тривалий період денервації скелетного м'язу передбачає появу атрофії м'язових волокон і, як наслідок, втрати контрактильних властивостей [26, 27].

В ряді послідовних досліджень в області використання хронічної ТЕС довготривало денервованих м'язів автори відмічають наявність резервів для регенерації і попередження атрофії у скелетних денервованих м'язах навіть через декілька років після денервації [5, 6].

Безумовно, оптимальним є використання запропонованої системи в комплексі з хірургічним відновленням ЛН або транспозицією КМО, що буде попередженням вищезгаданого м'язу при хронічній міостимуляції.

Отримані морфологічні результати дослідження КМО після використання прямої електричної стимуляції м'язу вказують на відсутність патологічних змін і навіть покращення у збереженні структури і об'єму КМО у порівнянні з контрольною групою.

Заключення

В представленій роботі проведено оцінку ефектів впливу електростимуляції на стан м'язового апарату після нейрорафії (в експерименті) і виявлено структурні і ультраструктурні зміни, які вказують на підвищення морфофункціональної активності відновлення регенерації м'язових волокон у досліді під впливом прямої електростимуляції. Окрім того, не виявлено специфічних патологічних змін під впливом прямої електростимуляції протягом періоду спостереження (30 діб).

Література

1. Abell KM, Baker RS, Cowen DE, Porter JD. Efficacy of gold weight implants in facial nerve palsy: Quantitative alterations in blinking. *Vision Res.* 1998;38(19):3019-23. doi: 10.1016/s0042-6989(98)00108-4.
2. Angelov DN, Neiss WF, Gunkel A, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Stennert E. Nimodipine accelerated hypoglossal sprouting prevents the postoperative hyperinnervation of target muscles after hypoglossal-facial anastomosis in the rat. *Restor Neurol Neurosci.* 1997;11(1):109-21. doi: 10.3233/RNN-1997-111212.
3. Bleicher JN, Hamiel S, Gengler JS, Antimarino J. A survey of facial paralysis: Etiology and incidence. *Ear Nose Throat J.* 1996;75(6):355-8.
4. Tsymbalyuk YuV, Malysheva TA, Rudenko SO, Vaslovich VV. Morphological changes in peripheral nerves after neurotaphy and electrical stimulation. *Morphologia.* 2013;7(4):78-85. [Article in Ukrainian].
5. Gittins J, Martin K, Sbeldrick J, Reddy A, Thean L. Electrical Stimulation as a Therapeutic Option to Improve Eyelid Function in Chronic Facial Nerve Disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(3):547-54.
6. Guo B-S, Cheung K-K, Yeung SS, Zhang B-T, Yeung EW. Electrical Stimulation Influences Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Unloading-Induced Muscle Atrophy in Mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e30348. doi: 10.1371/journal.pone.0030348.
7. Kinney SE, Seeley BM, Seeley MZ, Foster JA. Oculoplastic surgical techniques for protection of the eye in facial nerve paralysis. *Am J Otol.* 2000;21(2):275-83. doi: 10.1016/s0196-0709(00)80022-8.
8. Lee V, Currie Z, Collin JRO. Ophthalmic management of facial nerve palsy. *Eye (Lond).* 2004 Dec;18(12):1225-34. doi: 10.1038/sj.eye.6701383.
9. Liberson WT, Holmquest HJ, Scot D, Dow M. Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 1961;42:101-5.
10. May M, Shaitkin BM. The facial nerve. 2nd edition. Thieme Publishing Group; 2002.
11. Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;124(1):103-30.
12. Montserrat L, Benito M. Facial synkinesis and aberrant regeneration of facial nerve. *Adv Neurol.* 1988;49:211-24.
13. Otto RA. Restoration of function in the paralyzed rabbit orbicularis oculi muscle by direct functional electrical stimulation. *Laryngoscope.* 1997;107(1): 101-11. doi: 10.1097/00005537-199701000-00020.
14. Otto RA, Gaughan RN, Templer JW, Davis WE. Electrical restoration of the blink reflex in experimentally induced facial paralysis. *Ear Nose Throat J.* 1986;65(9):30-2, 37.
15. Rothstein J, Berlinger NT. Electronic reanimation of facial paralysis – A feasibility study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;94(1):82-5. doi: 10.1177/019459988609400114.
16. Salerno GM, Bleicher JN, McBride DM. Restoration of paralyzed orbicularis oculi muscle function by controlled electrical current. *J Invest Surg.* 1991;4(4):445-56. doi: 10.3109/08941939109141175.
17. Salerno GM, McClellan GA, Bleicher JN, Stromberg BV, Cheng SC. Electrical stimulation treatment of dog's denervated orbicularis oculi muscle. *Ann Plast Surg.* 1991;26(5):431-40. doi: 10.1097/0000637-199105000-00004.
18. Sachs NA, Chang EL. Electrical Stimulation of the Paralyzed Orbicularis Oculi in Rabbit. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2007;15(1):67-75. doi: 10.1109/TNSRE.2007.891372.
19. Shawe GD. On the number of branches formed by regenerating nerve-fibres. *Br J Surg.* 1955;42 (175):474-88. doi: 10.1002/bjs.18004217505.
20. Somia NN, Zonnevillje ED, Stremel RW, Maldonado C, Gossman MD, Barker JH. Multi-channel orbicularis oculi stimulation to restore eye-blink function in facial paralysis. *Microsurgery.* 2001;21(6):264-70. doi: 10.1002/micr.1050.
21. Tobey DN, Sutton D. Contralaterally elicited electrical stimulation of paralyzed facial muscles. *Otolaryngology.* 1978;86(5):ORL-812-8. doi: 10.1177/019459987808600528.
22. Tsymbalyuk YuV, Tretiak IB, Sapon MA. [The use of long-term electrical stimulation in the complex treatment of damage to the brachial plexus during childbirth]. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2013;(1):14-8. [Article in Ukrainian].
23. Zeale DL, Dedo HH. Control of paralyzed axial muscles by electrical stimulation. *Trans Sect Otolaryngol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1977; 84(2):310.
24. Willand MP. Electrical stimulation enhances reinnervation after nerve injury. *Eur J Transl Myol.* 2015;25(4):243-8. doi: 10.4081/ejtm.2015.5243.
25. Walter JS, Wurster RD, Zhu Q, Laghi F. Respiratory muscle pacing with chronically implanted intramuscular Permaloc electrodes: A feasibility study. *J Rehabil Res Dev.* 2011; 48(2):103-14. doi: 10.1682/jrrd.2010.05.0086.
26. Guo B-S, Cheung K-K, Yeung SS, Zhang B-T, Yeung EW. Electrical Stimulation Influences Satellite Cell Proliferation and Apoptosis in Unloading-Induced Muscle Atrophy in Mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e30348. doi: 10.1371/journal.pone.0030348.
27. Carraro U, Boncompagni S, Gobbo V, Rossini K, Zampieri S, Mosole S, et al. Persistent muscle fiber regeneration in long term denervation. Past, present, future. *Eur J Transl Myol.* 2015;25(2): 4832. doi: 10.4081/ejtm.2015.4832.

Надійшла до редакції 19.04.2022

© О.М. Борисенко, А.Л. Бобров, Т.А. Малишева, А.Є. Педаченко, 2022

**МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ТРИВАЛОЇ ПРЯМОЇ
ЕЛЕКТРОСТИМУЛЯЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОЕЛЕКТРИЧНОЇ
СИСТЕМИ НА ДЕНЕРВОВАНИЙ КРУГОВИЙ М'ЯЗ ОКА
ПРИ ОДНОБІЧНОМУ УРАЖЕННІ ЛИЦЕВОГО НЕРВА
В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

¹Бобров АЛ, ¹Борисенко ОМ, ²Малишева ТА, ¹Педаченко АС, ¹Панн ОВ

¹Державна установа "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України";

²Державна установа "Інститут нейрохірургії імені А.П. Ромоданова НАМН України"

E-mail: bobrov80andrey@gmail.com

А н о т а ц і я

Використання прямої електричної стимуляції для виклику скорочення денервованого кругового м'яза ока (КМО) при експериментальному паралічу лицевого нерва (ЛН) дозволяє отримати повне закриття очної щілини.

Метою даного дослідження є вивчення морфологічних змін у денервованому м'язі під впливом прямої електростимуляції двофазними імпульсами на протязі тривалого часу.

Матеріали та методи: В експерименті на 12 статевозрілих тваринах була створена модель однобічного ураження ЛН з послідовним паралічем КМО у всіх тварин. Тварини були розподілені на 2 групи: основну і контрольну. В основній групі тваринам проводилась імплантація стимулюючої частини біоелектричного пристрою для закриття ока по типу зворотного зв'язку, після чого було перевірено можливість роботи в режимі реального часу для виконання довготривалої стимуляції денервованого кругового м'яза ока. У контрольній тварині не отримували жодного впливу на КМО. Через 30 діб у всіх тварин було проведено видалення КМО на боці паралічу ЛН з наступним морфологічним дослідженням.

Результати: За даними міжгрупового порівняльного аналізу із застосуванням непараметричного критерію U-Манна-Уїтні зміни індексу проліферації Ki-67 наявна статистично значуща різниця між групою порівняння та експериментальною групою, що піддавалася впливу електростимуляції з підвищенням цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 28,3 (25,0; 30,8) до 30,9 (28,8; 33,3), тобто в 1,1 рази ($p=0,04$); при аналізі зміни питомої площі мітохондрій наявна статистично значуща різниця між групою порівняння та експериментальною групою з підвищенням цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 10,5 (6,3; 14,4) до 15,8 (12,8; 17,6), тобто в 1,5 рази ($p=0,0004$); при порівняльному аналізі зміни питомої площі міофібрил також спостерігалось статистично значуще підвищення цього показника для групи з електростимуляцією в порівнянні з контрольною групою з 48,9 (40,6; 63,0) до 64,4 (60,0; 72,4), тобто в 1,3 рази ($p=0,00005$).

Висновки: проведена оцінка ефектів впливу електростимуляції на стан м'язового апарату після нейрорафії (в експерименті) виявила структурні і ультраструктурні зміни, які вказують на підвищення морфофункціональної активності відновлення регенерації м'язових волокон у досліді під впливом прямої електростимуляції. Окрім того, не виявлено специфічних патологічних змін під впливом прямої електростимуляції на протязі 30 діб.

**MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECT OF CONTINUOUS DIRECT ELECTROSTIMULATION
WITH THE HELP OF THE BIOELECTRIC SYSTEM ON THE DENERVATED CIRCULAR MUSCULATURE
OF THE EYE IN CASE OF EXPERIMENTAL SINGLE FACIAL NERVE INJURY**

¹Bobrov AL, ¹Borisenko OM, ²Malisheva TA, ¹Pedachenko AE, ¹Papp OV

¹State Institution «O. S. Kolomiychenko Institute of otolaryngology of National academy of medical sciences of Ukraine»;

²The State Institution "Romodanov Neurosurgery Institute of National Academy of Medical Science of Ukraine"

E-mail: bobrov80andrey@gmail.com

A b s t r a c t

The use of direct electrical stimulation to produce shortening of the denervated circular oculus in experimental facial nerve palsy (FNP) allows for complete closure of the ocular slit.

The aim of this study is to study morphological changes in the nerves under the influence of direct electrical stimulation with biphasic pulses over a long period of time.

Materials and methods: A model of a single facial nerve injury with consequent paralysis of orbicularis oculi muscle was created in the experiment on 12 adult animals. The animals were divided into 2 groups: main and control. In the main group, the stimulating part of the bioelectric device for eye closure was implanted, after which the ability to work in real-time mode to perform long-duration stimulation of orbicularis oculi muscle was tested. The control group did not receive any effect effects on orbicularis oculi muscle. After 30 days, all the animals underwent orbicularis oculi muscle elimination on the side of the facial nerve palsy with the following morphological examination.

Results: An intergroup comparative analysis using the nonparametric U-Mann-Whitney criterion for changes in the Ki-67 proliferation index revealed a statistically significant difference between the comparison group and the experimental group, that was affected by the electrical stimulation with the increase of the parameter for the group with electrical stimulation according to the control group from 28,3 (25,0; 30,8) to 30,9 (28,8; 33,3), or 1.1 times ($p=0,04$); Analysis of variation in mitochondrial photocurrent density revealed statistically significant differences between the control group and the experimental group, with the increase of this parameter for the group with electrical stimulation compared with the control group from 10.5 (6.3; 14.4) to 15.8 (12.8 17,6), i.e. by 1.5 times ($p=0.0004$); a statistically significant increase of the parameter for the group with electrical stimulation versus the control group from 48,9 (40,6; 63,0) to 64,4 (60,0; 72,4), i.e. by a factor of 1.3 ($p=0.00005$).

Conclusions: The assessment of the effects of electrostimulation on the musculoskeletal apparatus after neuroraphy (in the experiment) revealed structural and ultrastructural changes, indicating the increased morphofunctional activity of renewed regeneration of muscle fibers in the study under the influence of direct electrical stimulation. In addition, no specific pathological changes were detected under the influence of direct electrostimulation for 30 days.