

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р П. СТОЯНОВ” - ВАРНА
КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ**

СТОЯН ПАВЛОВ ПАВЛОВ

**ЕФЕКТ НА ПРОМЕНЕНАТА ТРИГЕМИНАЛНА СЕТИВНОСТ
ВЪРХУ ПРОРАСТВАНЕТО НА АКСОНАЛНИ КОЛАТЕРАЛИ,
КАЧЕСТВОТО НА МУСКУЛНАТА РЕИНЕРВАЦИЯ И
ВЪЗСТАНОВЯВАНЕТО НА КООРДИНИРАНИ МОТОРНИ
ФУНКЦИИ СЛЕД ПРЕРЯЗВАНЕ НА ЛИЦЕВИЯ НЕРВ ПРИ
ВЪЗРАСТНИ ПЛЪХОВЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”

Научна област: Медицина, шифър 03.01.00

Научна специалност: „Анатомия, хистология и цитология”,
шифър 03.01.02

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ

Проф. Д-р Дойчин Ангелов, дмн

Доц. Д-р Минко Минков, дм

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ

Проф. д-р Христо Чучков, дмн

Доц. д-р Димка Хинова-Палова, дмн

Варна, 2011

Дисертантът работи като главен асистент към Катедрата по Анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна. Експерименталната работа по този труд е извършена под ръководството на проф. д-р Дойчин Ангелов, дмн в Първи Анатомичен Институт на Университетския Анатомичен Център към Университета в гр. Кьолн, Германия. Дисертационният труд е от областта на специалността „Анатомия, хистология и цитология” - шифър 03.01.02. Представен е на 158 страници и е онагледен с 14 таблици и 34 фигури (включващи общо 77 снимки и графики). Цитирани са 389 литературни източника на латиница. Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – Варна на 18.11.2011 г. и насочен за защита пред Научно жури.

Адрес на автора:

Катедра по анатомия, хистология и ембриология
Медицински Университет
„ Проф. д-р Параскев Стоянов,,- Варна
ул. „Проф. Марин Дринов” 55
9002 Варна
България
E-mail: stoyan.pavlov@mu-varna.bg
drstoyanpavlov@gmail.com

Проучванията описани в този труд бяха финансово подкрепени от Европейската програма за обучение през целия живот Sokrates/Erasmus, Фондация „Jean-Uhrmacher”, Изследователската програма „Köln Fortune” и Немското Изследователско Общество (Deutsche Forschungsgemeinschaft; DFG; AN 331/3-1, AN 331/5-1).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....2012 г. отч. в Залана Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” гр. Варна на открито заседание на Научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение в Библиотеката на МУ, гр. Варна.

Въведение	7
Цел и задачи	8
Собствени Проучвания	10
Материал и Методи	10
Резултати.....	15
Механичната стимулация на денервираните мускули благоприятства възстановяването на движенията	15
Подпомогнатото чрез мануална стимулация възстановяване на двигателна активност след увреда на лицевия нерв изисква интактни сетивни пътища	29
Регенериращата сетивна обратна връзка затруднява, но не възпрепятства напълно възстановяването на двигателна активност след смесена нервна увреда (моторна и сензорна).....	32
Дискусия.....	42
Мануалната стимулация подпомага възстановяването на вибрисната функция след прекъсване и хирургична реконструкция на лицевия нерв.	42
Анатомичният еквивалент на възстановената вибрисна двигателна функция е подобреният модел на реинервация.	44
Мануалната стимулация препятства деаферентацията на регенерираните лицеви мотоневрони.	46
Подпомогнатото чрез мануална стимулация възстановяване на двигателна активност след увреда на лицевия нерв изисква интактни сетивни пътища.	48
Адекватната неинвазивна стимулация подобрява вибрисната двигателна функция и модела на реинервация на мускулите мишени по време на едновременната регенерация след увреда на лицевия и троичния нерв..	49
Механизми за осъществяване ефектите на асиметричната ипсилатерална стимулация (дMS и дVS).....	51
Изводи.....	58
Справка за приносите на дисертационния труд.....	59
Публикации във връзка с дисертационния труд.....	62
Научни доклади и съобщения, изнесени на научни конференции, конгреси и симпозиуми	62

Съкращения, използвани в текста (изброени по азбучен ред):

• на български език

ЕМГ	електромиография
ЕС	електростимулация
ЕЦМ	екстрацелуларен матрикс
МОЦ	микротубулни организиращи центрове
мРНК	матрична рибонуклеинова киселина
ПНС	периферна нервна система
ПШК	перисинаптични Шванови клетки
ЦНС	централна нервна система

• на латиница

BDNF	brain derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum albumine
C.I.	confidence interval of the mean (интервал на доверителност на средната)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DiI	1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
FB	Fast Blue
FG	Fluoro-Gold
FGF-1 (aFGF)	acidic fibroblast growth factor
FGF-2 (bFGF)	basic fibroblast growth factor
FGF-5	fibroblast growth factor 5
GDNF	glia derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GTP	guanosinetriphosphate
IGF-I	insulinlike growth factor I
IGF-II	insulinlike growth factor II
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NSE	neuron specific enolase
NSS	normal sheep serum
NT-3	neurotrophin 3
NT-4	neurotrophin 4

NT-5	neurotrophin 5
PrV	nucleus principalis nervi trigemini (V)
SpCV	nucleus spinalis caudalis nervi trigemini (V)
SpIV	nucleus spinalis interpolaris nervi trigemini (V)
SpOV	nucleus spinalis oralis nervi trigemini (V)
TBS	tris buffer saline
TGF- β	transforming growth factor β
TrkB	thyrosinkinase B
vCPG	vibrissal central pattern generator
WFEM	Widefield Epifluorescent Microscope

• хирургични интервенции и стимулационни протоколи (на български и латиница)

дFFA	прерязване и зашиване на десния лицев нерв край-в-край
IONex	ексцизия на ипсилатералния п. infraorbitalis
ТТА	прекъсване и зашиване край-в-край на десния подочничен клон на п. trigeminus (п. infraorbitalis)
дMS	десностранна мануална стимулация
лMS	левостранна мануална стимулация
ЕЕ	стимулация чрез „обогатена” среда за живот (enriched environment)
ТК	тактилен контакт
дVS	десностранна вибрисна стимулация чрез форсирана ипсилатерална свръхупотреба на мустачките

Въведение

Лицевият нерв е най-често уврежданият нерв при травми на главата и шията. Освен при пътнотранспортни произшествия и огнестрелни наранявания, съпроводени с фрактури на слепоочната кост и/или разкъсвания на лицето, повечето лезии на лицевия нерв са постоперативни. Нервът се уврежда най-често при интервенции за премахване на тумори на церебело-понтинния ъгъл и акустичен невром, поставяне на кохлеарни импланти, резекции на околоушната жлеза поради малигненост и др. Независимо от използването на фини микрохирургични техники при съединяването на прекъснатите нерви при човека, възстановяването на волевите движения на всички 42 лицеви мускула е лошо, а мимиката остава бедна (Anonsen et al., 1986; Vaughan and Richardson, 1993; Ferreira et al., 1994; Goodmurphy and Ovalle, 1999). Неизбежният постпаралитичен синдром се състои от масови движения (синкинезии), частични парези и променени рефлексии (Kimura et al., 1975; Bento and Miniti, 1993; Baker et al., 1994). Дисбалансът в лицевия тонус и нарушената волева и неволева емотивна моторика на лицевата мускулатура от своя страна могат да причинят тежки психо-социални нарушения.

Постпаралитичният синдром се отдава на (i) погрешно насочвана реинервация (Montserrat and Benito, 1988; Sumner, 1990), (ii) обмен на абнормно интензивни нервни импулси между аксони принадлежащи към различни снопове (Sadjadpour, 1975), и (iii) промени в синаптичното покритие на лицевите мотоневрони (Bratzlavsky and v. Eecken, 1977; Graeber et al., 1993; Moran and Neely, 1996).

Погрешно насочената или “аберантна” реинервация се счита за главната причина за постпаралитичния синдром. Тя притежава два компонента: (i) поради недостатъчно или неизправно аксонално насочване, даден мускул се реинервира от “чужди” аксони, които са се “заблудили” и прораснали по дължината на “погрешно” нервни снопове (Aldskogius and Thomander, 1986); (ii) поради наличието на многобройни конкуриращи се аксонални клончета (колатерали) произхождащи от всички прерязани аксони (Dyck and Hopkins, 1972), едно мускулно влакно може да бъде реинервирано от няколко аксона на мотоневрони (полиневронна инервация; Gorio et al., 1983; Fu and Gordon, 1997).

Съвременните методи за лечение на периферната нервна увреда включват комбинация от хирургични техники, терапия и физикална рехабилитация за минимализиране на последствията от аберантната реинервация. Понастоящем, тъй като липсва пълна яснота относно факторите ограничаващи функционалното възстановяване след периферна нервна увреда, съществуват огромен брой протоколи за лечение на постпаралитичните явления, които често дават противоречиви резултати. Експерименталното изясняване на процесите и факторите ограничаващи функционалното възстановяване след периферна нервна увреда би

допринесло за разработване на качествени, базирани на доказателства, протоколи за лечение на травматичната периферна невропатия. От друга страна разработването на терапевтични подходи за неинвазивно повлияване на процесите на периферната нервна регенерация би било от съществено значение за лечението на редица периферни дегенеративни невропатии свързани с Валеро-подобна аксонална дегенерация (напр. диабетна невропатия, вирусни и токсични невропатии, някои форми на синдрома на Guillain-Barre и др.).

Моделът на аксотомията на лицевия нерв при плъхове е най-разпространеният модел за изучаване на тези явления (Moran and Graeber, 2004). Най-съществените му предимства са пълното разделяне на моторна и сетивна инервация на мустачковата възглавничка, лесен хирургичен достъп до ствола на нерва, висока преживяемост на животните и др. Преимуществовата на този модел стават причина той да бъде популяризиран като експериментална парадигма за системното изучаване на нервната регенерация и дегенерация (Moran and Graeber, 2004).

Представената дисертация представлява авторско обобщение на част от експерименталния труд, извършен от научен колектив с ръководител проф. д-р Дойчин Ангелов. Обобщението е осъществено със съгласието на всички експериментатори от колектива и е в съгласие с техните собствени научни изводи.

Подобно представяне се налага от сложността и продължителността на експериментите, както и от необходимостта от специални хирургични умения за осъществяване на хирургичните манипулации. Без специализацията на отделните експериментатори в провеждането на един или няколко от експериментите, не би могло да се осигури получаването на качествени и достоверни резултати. От друга страна обобщение само въз основа на един аспект от експерименталните проучвания би било непълно и не би могло да осигури категорични изводи.

Цел и задачи

Основната цел, която си поставихме в настоящата работа е да проверим дали промени в тригеминалната сетивност биха повлияли благоприятно възстановяването на функциите на вибрисната мускулатура след лезия на лицевия нерв у плъхове. Един положителен отговор би могъл да обясни благоприятните ефекти на механичната стимулация на вибрисната мускулатура (скъсен период на възстановяване и подобрена функция на вибрисния апарат) върху реинервацията на денервираните след прекъсване и зашиване на лицевия нерв мускули и значението на интактната тригеминална аферентация за развитието на тези благоприятни ефекти задачи:

1. Изясняване на влиянието на различни методи за неинвазивно третиране на вибрисната мускулатура след прекъсване и зашиване на лицевия нерв върху:

- 1.1. Качеството на възстановяване на вибрисната двигателна функция;
- 1.2. Колатералното аксонално разклоняване в мястото на нервна увреда;
- 1.3. Качеството на реинервация на таргетната мускулатура (терминално аксонално разклоняване и полиинервация);

1.4. Промените в общия синаптичен вход, индивидуалното синаптично покритие на лицевите мотоневрони и астроцитната реакция в двигателното ядро на лицевия нерв, като израз на най-драматичните пластични промени след аксотомията.

2. Изясняване ролята на обратната сетивна връзка посредством системата на троичния нерв (интактна и увредена) за възстановяването на двигателната функция след увреда на лицевия нерв и последваща мануална стимулация на денервираните мускули (дMS), оценена чрез:

- 2.1. Качеството на възстановяване на вибрисната двигателна функция;
- 2.2. Качеството на реинервация на таргетната мускулатура (терминално аксонално разклоняване и полиинервация).

3. Изясняване на ефектите на неинвазивната стимулация върху възстановяването в условията на едновременна моторна и сензорна нервна увреда и регенерация (на лицевия и троичния нерв), оценени чрез:

- 3.1. Качеството на възстановяване на вибрисната двигателна функция;
- 3.2. Колатералното аксонално разклоняване в мястото на моторната нервна увреда;
- 3.3. Качеството на реинервация на таргетната мускулатура (терминално аксонално разклоняване и полиинервация);
- 3.4. Синаптичния вход към ядрото на лицевия нерв и синаптичното покритие на лицевите мотоневрони.

Собствени Проучвания

Материал и Методи

Реактиви

Първични антитела

- **анти- β -тубулин** от **невронален клас III** – поликлонално антитяло от заек (Covance, Richmond, CA, USA);
- **анти-синаптофизин** – поликлонално антитяло от заек (Biometra);
- **анти-GFAP** – поликлонално антитяло от морско свинче (serum GP52; Progen);

Флуоресцентни маркери

- ретроградно маркиране на лицевите мотоневрони: **1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate** (DiI; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), **Fluoro-Gold** (FG; Fluorochrome Inc., Denver, Colorado, USA), и **Fast Blue** (FB; EMS-Chemie GmbH, Großumstadt, Germany);
- маркиране на моторните плочки в мускулите мишени: **конюгиран с Alexa Fluor 488 α -бунгаротоксин** (Molecular Probes);
- вторични антитела и визуализиращи системи: **Cy3-конюгиран анти-заешки IgG** (Sigma); **биотинилирано антитяло от коза срещу IgG на морско свинче** (Sigma), **стрептавидин-Cy3 конюгат** (Sigma).

Други

- **говежди серумен албумин** (BSA, Sigma);
- **нормален серум от овца** (NSS; Sigma);
- **нормален серум от коза** (NGS; Sigma);
- др.

Животински материал

За провеждането на експериментите описани в този труд бяха използвани 200 млади (2 месеца) полово зрели женски плъха (175 – 200 g) от порода Wistar (линия HsdCpb:WU, Harlan-Winkelmann, Borchon, Germany), както следва:

- 108 животни, разпределени в 7 групи, за провеждането на експериментите по първа задача - "Ефекти на различни методи за неинвазивно третиране на парализираните вибрисни мускули след увреда на лицевия нерв (механична стимулация, отглеждане в обогатена среда и тактилен контакт)";
- 12 животни, разпределени в 2 групи, за провеждането на експериментите по втора задача - „Роля на обратната сетивна връзка посредством системата на троичния нерв (интактна и увредена) за възстановяването на двигателната функция след увреда на лицевия нерв и последваща мануална стимулация на денервираните мускули,;”

- 80 животни, разпределени в 5 групи, за провеждането на експериментите по втора задача - „Роля на неинвазивната стимулация за възстановяването след едновременна увреда и регенерация на лицевия и троичния нерв,,.

Преди и след експериментите всички плъхове бяха отглеждани при стандартизирани условия – стандартна лабораторна храна (Altromin, D-32791 Lage, Germany; Ssniff, Soest, Germany), вода *ad libitum* и при изкуствен дневен цикъл с продължителност на светлата и тъмна част от денонощието съответно по 12 часа. Всички експерименти бяха проведени в съответствие с немския “Закон за защита на животните” и одобрени от местната комисия за защита на животните към регионалната управа на окръг Кьолн.

Хирургични интервенции

- **Прекъсване и край-в-край анастомоза на десния лицев нерв (дFFA).** Лицевият нерв се отрепарирваше и прерязваше близо до появата му през *foramen styломastoideum*, след което проксималният и дисталният фрагменти се съединяваха микрохирургически с два атравматични шева с дебелина 11-0 (Ethicon, Norderstedt, Germany);
- **Ексцизия на ипсилатералния n. *infraorbitalis* (IONex)** се извършваше непосредствено след дFFA. Под все още действащата Ketamin/Xylazin анестезия, ипсилатералният n. *infraorbitalis* се прекъсваше близо до изхода му през f. *infraorbitale* и всички негови дистални снопчета се премахваха.

Прекъсване и зашиване на десния n. *infraorbitalis* (TTA) се извършваше непосредствено след дFFA. Под все още действащата анестезия, ипсилатералният n. *infraorbitalis* се откриваше близо до изхода му през f. *infraorbitale* и всички негови 4-6 клончета се прекъсваха и зашиваха едно по едно.

По време на всички оперативни интервенции животните бяха анестезирани с 100 mg/kg Ketanest® (Parke-Davis/Pfizer, Karlsruhe, Germany) и 5 mg/kg Rompun® (Bayer, Leverkusen, Germany), приложени интраперитонеално.

Протоколи за постоперативна неинвазивна стимулация

- **Мануална стимулация на вибрисните мускули,** чрез ритмично поглаждане напред на десните (дMS) или левите (лMS) мустачки и мускули на мустачковите възглавнички.
- **Стимулация чрез обогатена среда за живот (EE)** – животните, третирани по този начин, живееха заедно и сред обогатена среда, състояща се от хоризонтални и наклонени платформи и различни играчки (висящи драперии, мостове, тунели, стълби, топки). Обектите на обогатената среда бяха размествани като на случаен принцип се премахваха или добавяха елементи по време на целия експеримент, както е описано от van Praag и сътр. (2000).

- **Тактилен контакт (ТК)** – животните, третирани по този начин бяха държани в ръка, както при MS, но стимулация не беше извършвана.
- **Стимулация чрез усилена ипсилатерална вибрисна свръхупотреба** - В деня след оперативната интервенция животните, третирани по този начин, бяха поставяни под лека наркоза (Isofluran, O₂ and Niontix: N₂O; Linde AG, Pullach, Germany), след което всички мустачки от срещуположната на интервенцията страна (лявата) бяха изрязани. Тази процедура се повтаряше всеки трети ден в продължение на целия период на стимулацията.

Методи

Видео - анализ на експлоративната вибрисна двигателна активност. Видео базираният анализ на движенията при експлоративната вибрисна двигателна активност се извършваше както е описано преди това при плъхове (Guntinas-Lichius et al., 2002; Tomov et al., 2002; 2005) и при мишки (Angelov et al., 2003; Guntinas-Lichius, Angelov, et al., 2005). *Инструментарium:* Ограничител за гризачи; дигитална видеокамера Panasonic NV DX-110 EG; полуавтоматична система за 2D видео анализ PEAK Motus 2000 (PEAK Performance Technologies, Inc., Englewood, CO).

Оценка на аксоналното разклоняване чрез тройно ретроградно маркиране. *r. zygomaticus*, *r. buccalis* и *r. marginalis mandibulae n. facialis* бяха обработни под обща анестезия на в продължение на 30 мин. съответно с кристали DiI, FG, FB, след което единично и двойно маркираните неврони в ядрото на лицевия нерв бяха преброени както е описано от Dohm et al., 2000. *Инструментарium:* вибратор; епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 50 (Zeiss, Oberkochen, Germany); изготвен по поръчка комплект от лентови филтри (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany), който максимално ограничава преплитането между флуоресцентните сигнали на маркерите; CCD видео система Optronics DEI-470 (Goleta, CA, USA); софтуер Optimas 6.5. (Optimas Corporation, Bothell, Washington, USA).

Анализ на реинервацията на мускулите мишени. Отношението между моно- и полиинервирани моторни плочки в таргетните мускули се осъществи по описания от Guntinas-Lichius и сътр. (2005) начин посредством двойно хистохимично оцветяване на аксоните с анти- β -тубулин от невронален клас III и на моторните плочки с конюгиран с Alexa Fluor 488 α -бунгаротоксин. *Инструментарium:* криостат; епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 50 (Zeiss, Oberkochen, Germany); комплект от лентови филтри (Zeiss, Oberkochen, Germany), който максимално ограничава преплитането между флуоресцентните сигнали на маркерите.

Синаптично покритие на лицевите мотоневрони се оценяваше на 8-битови или 16-битови дигитални образи от серийни срези през ядрото на оперирания и интактния лицев нерв, оцветени имунохистохимично за

синаптофизин. *Инструментарий:* епифлуоресцентен микроскоп Axioskop50 (Zeiss, Oberkochen) и Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Germany), комплект филтри EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590 (комплект №15 на Carl-Zeiss), дигитална CCD камера JENOPTIK "ProgRes C14" (Wenzel Mikroskoptechnik GmbH, 07743 Jena), обезпечена със софтуерния пакет Image-Pro Plus (Weiss Imaging and Solutions GmbH, 85232 Günding/Bergkllirchen) и бавно сканираща CCD камера Spot RT3 Slider (Diagnostic Instruments, Inc., USA).

Ретроградно маркиране на лицевите мотоневрони и псевдоуниполярни неврони от ganglion trigeminale, инервиращи мустачковата възглавничка. Под дълбока етерна наркоза 1mg FB (разтворен в 100 µl дестилирана вода, 2% диметил сулфоксид) бе инжектиран подкожно в мустачковата възглавничка на идентично място от здравата и оперираната страна на всяко животно. Манипулацията маркира ретроградно както лицевите мотоневрони, така и псевдоуниполярните неврони от *g. trigeminale*, които са реинервирани съответния участък от мустачковата възглавничка. Количествената оценка се извършваше съответно, на серийни вибраторни срези през ядрото на оперирания и интактния лицев нерв (като част от преценката на синаптичното покритие) и на серийни криостатни срези през *g. trigeminale*, на оперирания и интактния троичен нерв. *Инструментарий:* вибратор, (съотв. криостат), епифлуоресцентен микроскоп Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Germany), бавно сканираща CCD камера Spot RT3 Slider (Diagnostic Instruments, Inc., USA), комплект филтри EX BP 365/12, EM LP 397 (комплект №01 на Carl Zeiss).

Количествена оценка на синаптофизиновите образи: Синаптофизин-поитивните образи бяха филтрирани по модифициран „Top – Hat Opening by reconstruction” алгоритъм: i) дигитална гранулометрия за определяне на максимален размер на частиците; ii) ерозия с „Минимум” филтър с радиус равен на определения максимален размер; iii) реконструкция на деградираните снимки от оригиналните образи; iv) дигитално изваждане на получения образ на фона от оригиналните снимки; v) бинаризиране на образите, разделяне на частиците и почистване на шума от образите (при необходимост). Количествената оценка се извършваше автоматично върху цяла област от ядрото на лицевия нерв или върху перисоматични области на интерес с дебелина 4 µm получени посредством ръчно или автоматично (при ретроградно маркираните с FB мотоневрони) избиране на периметъра на тялото на съответния мотоневрон. *Използван софтуер:* ImageJ v.1,44c (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA); Grayscale Granulometry for ImageJ, Prodanov D., (<http://www.diagnosticarea.com/plugins/gmplugins.html#gran>); Landini G., GreyscaleReconstruct_v.2.1 for ImageJ (<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software>).

Ръчно преброяване на перисоматичните синаптофизин-положителни частици с помощта на конфокален лазерен сканиращ микроскоп (CLSM).. Перисоматичните синаптофизин-положителни частици бяха преброявани ръчно само на един образ за всяка клетка на нивото на най-големия площ напречен срез през тялото на мотоневрона. *Инструментриум*: конфокален микроскоп TCS SP5 (Leica). *Използван софтуер*: Image Tool 2.0 (University of Texas, San Antonio, TX, (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/>)).

Астроцитната реакция в ядрото на лицевия нерв се оценяваше на 8-битови дигитални образи от серийни срези през ядрото на оперирания и интактния лицев нерв, оцветени имунохистохимично за GFAP. епифлуоресцентен микроскоп Axioskop50 (Zeiss, Oberkochen), комплект филтри EX BP 546/12, BS FT 580, EM LP 590 (комплект №15 на Carl-Zeiss), дигитална CCD камера JENOPTIK "ProgRes C14" (Wenzel Mikroskoptechnik GmbH, 07743 Jena), обезпечена със софтуерния пакет Image-Pro Plus (Weiss Imaging and Solutions GmbH, 85232 Günding/Bergkirchen).

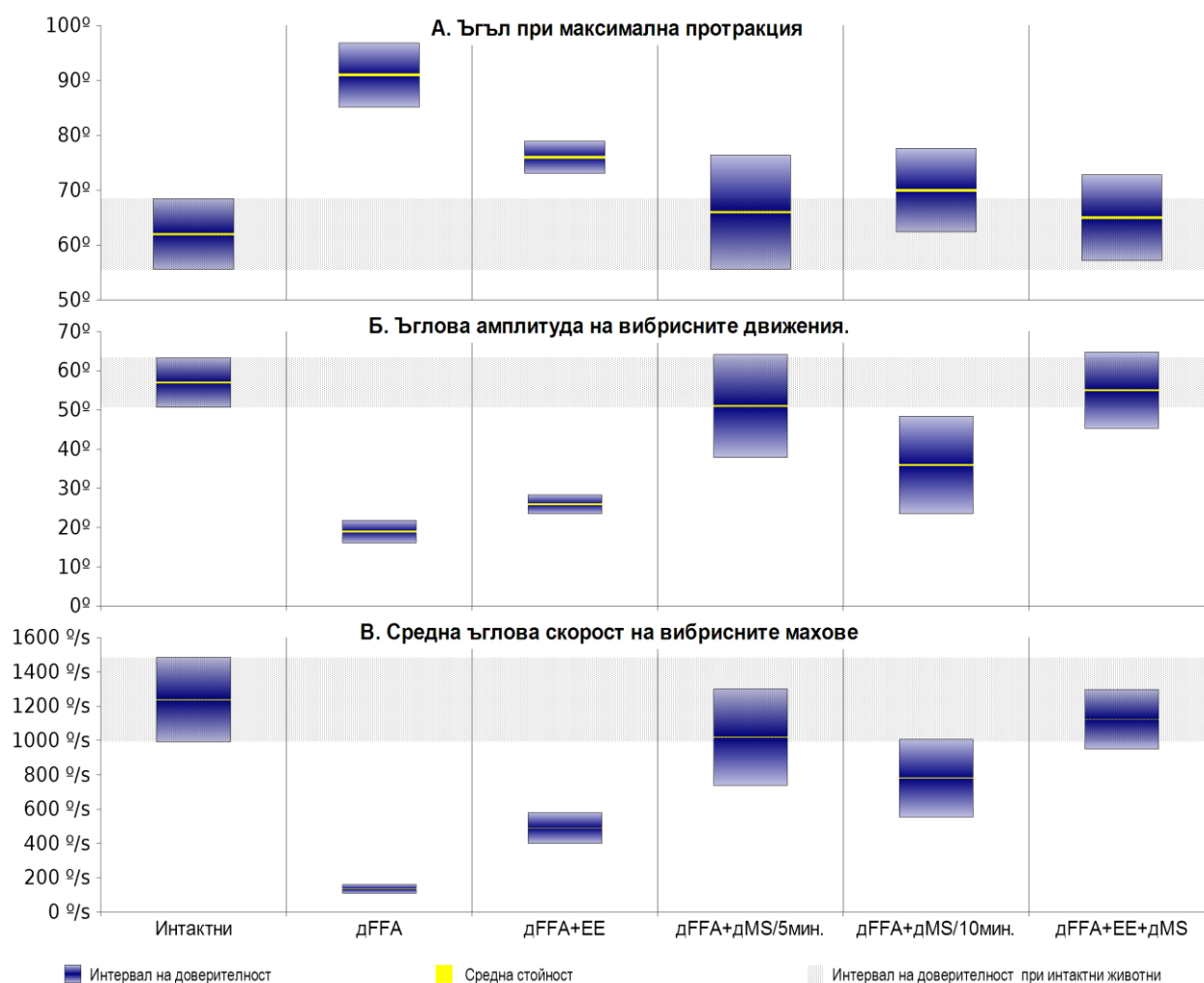
Количествена оценка на астроцитната реакция. i) шесткратна субтракция на фона по алгоритъма „търкаляща се топка” с радиус 10 px (rolling ball); ii) бинаризиране на образите (праг - яркост 2 на сивия цвят). Така се получаваха образи с много добре изолирани GFAP-позитивни структури, но с голямо количество прибавен шум, както поради по слабата субтракция на фона, така и поради наличието на силно изразено неспецифично светене в някои неврони, дължащо се най-вероятно на липофусцинови отлагания. iii) За корекция бяха използвани „негативни” образи заснети веднага след позитивните (без разместване на препарата) през филтърен комплект №10 на Carl Zeiss (EX BP 450-490, EM BP 515-565), който не пропуска специфичната флуоресценция от Cy3. Негативните образи се обработваха, като се замъгляваха с медианен филтър (median filter) с радиус 8px и след това се обработваха rolling ball алгоритъм, с радиус 15px, след което се бинаризираха с праг на сивото 1. iv) изваждане на „негативните” образи от „позитивните”; v) отваряне с коефициент 8 за изчистване на фоновия шум. vi) Автоматично измерване на GFAP позитивната площ. *Използван софтуер*: ImageJ v.1.44c (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Резултати

Механичната стимулация на денервираните мускули благоприятства възстановяването на движението

Мануалната стимулация подпомага възстановяването на вибрисната функция.

Първоначално проучихме влиянието на мануалната стимулация върху възстановяването на функцията. Честотата на маховете с мустачки при интактни плъхове, измерена с нашата методика е $7,0 \text{ Hz} \pm 0,8 \text{ Hz}$ ¹.



Фигура 1: Анализ на вибрисната двигателна функция два месеца след хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв (дFFA). Показателите са представени чрез средната им стойност (жълта линия) в рамките на интервала на доверителност на средната (син стълб). Възстановяване към нива, измерени преди увредата (сиво засенчване) се наблюдава само при животните подложени на самостоятелна или комбинирана MS от страната на увредата.

¹ Всички докладвани резултати в текста тук и в останалите глави са представени като вариационни редове чрез средната стойност \pm едно стандартно отклонение. В графиките и таблиците за нуждите на сравнението средните резултати са представени в границите на интервала на доверителност при уронен на значимост $p=0,05$.

Ъгълът при максимална протракция варира около $62^\circ \pm 13,2^\circ$, амплитудата на движенията от максимална протракция до максимална ретракция съответно е $57^\circ \pm 13^\circ$, а ъгловата скорост по време на протракция – $1238^\circ/\text{sec} \pm 503^\circ/\text{sec}$. (Фиг. 1).

Честотата на маховете при плъховете от всички експериментални групи бе също **около 7 Hz**. Показателите за функционално възстановяване на вибрисните движения – ъгъл при максимална протракция, амплитуда между максимална протракция и ретракция и ъгловата скорост по време на протракция, показаха значителна вариабилност. Два месеца след десностранно прекъсване и зашиване на лицевия нерв без последващо третиране (дFFA) **ъгълът при максимална протракция** остава относително голям – $91^\circ \pm 12^\circ$. Това е съпроводено от силно редуцирани **амплитуда на движенията** – $19^\circ \pm 6^\circ$, и **ъглова скорост по време на протракцията** – $135^\circ/\text{sec} \pm 54^\circ/\text{sec}$. (Фиг. 1)

Влошаване на тези показатели от същия порядък бе наблюдавано и при плъховете подложени на:

- a. дFFA и последваща ежедневна десностранна мануална стимулация с продължителност 1 min (дFFA+дMS за 1 min) - **ъгъл при максимална протракция $89^\circ \pm 6,2^\circ$, амплитуда на движенията $13^\circ \pm 4^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $175^\circ/\text{sec} \pm 68^\circ/\text{sec}$;**
- b. дFFA и последваща ежедневна дMS с продължителност 2 min (дFFA+дMS за 2 min) - **ъгъл при максимална протракция $91^\circ \pm 10^\circ$, амплитуда на движенията $14^\circ \pm 7^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $159^\circ/\text{sec} \pm 127^\circ/\text{sec}$;**
- c. дFFA и последваща ежедневна контралатерална (левостранна) мануална стимулация (дFFA+лMS) - **ъгъл при максимална протракция $94^\circ \pm 9,5^\circ$, амплитуда на движенията $20^\circ \pm 9,5^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $368^\circ/\text{sec} \pm 118^\circ/\text{sec}$;**
- d. дFFA и тактилен контакт (дFFA+ТК) - **ъгъл при максимална протракция $104^\circ \pm 10,1^\circ$, амплитуда на движенията $18^\circ \pm 3,4^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $316^\circ/\text{sec} \pm 71^\circ/\text{sec}$.**

Общото при тези групи е, че се наблюдава увеличение на ъгъла при максимална протракция средно с около 50% и снижение в амплитудата на движенията и скоростта по време на протракция съответно с около 70% и 80%.

Мануалната стимулация на ипсилатералните мустачки за 5 мин дневно (дFFA+дMS за 5 мин) имаше драматичен ефект, който се състоеше във възвръщане на нормалната функция, демонстрирано чрез ъгъла при максимална протракция - $66^\circ \pm 15^\circ$, амплитудата на движенията - $51^\circ \pm 19^\circ$ и ъгловата скорост по време на протракцията $1019^\circ/\text{sec} \pm 408^\circ/\text{sec}$ (Фиг. 1).

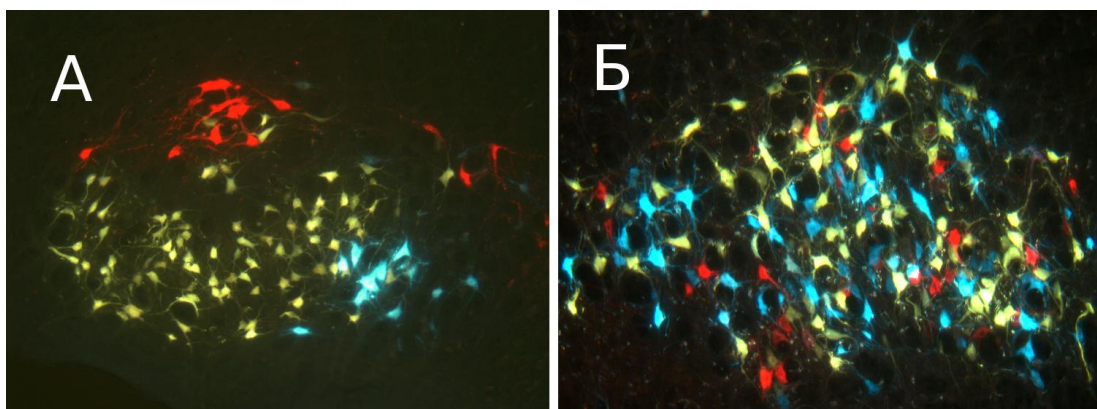
Същото се наблюдава и при групите животни, подложени на същестранна мануална стимулация с продължителност 10 мин (дFFA+дMS за 10 мин) - ъгъл при максимална протракция $70^\circ \pm 11^\circ$, амплитуда на

движенията $36^\circ \pm 18^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $781^\circ/\text{sec} \pm 329^\circ/\text{sec}$, и на комбинирано третиране с мануална стимулация и обогатена среда за живот (дFFA+дMS+EE) - ъгъл при максимална протракция $65^\circ \pm 16^\circ$, амплитуда на движенията $55^\circ \pm 20^\circ$, ъглова скорост по време на протракцията $1124^\circ/\text{sec} \pm 358^\circ/\text{sec}$.

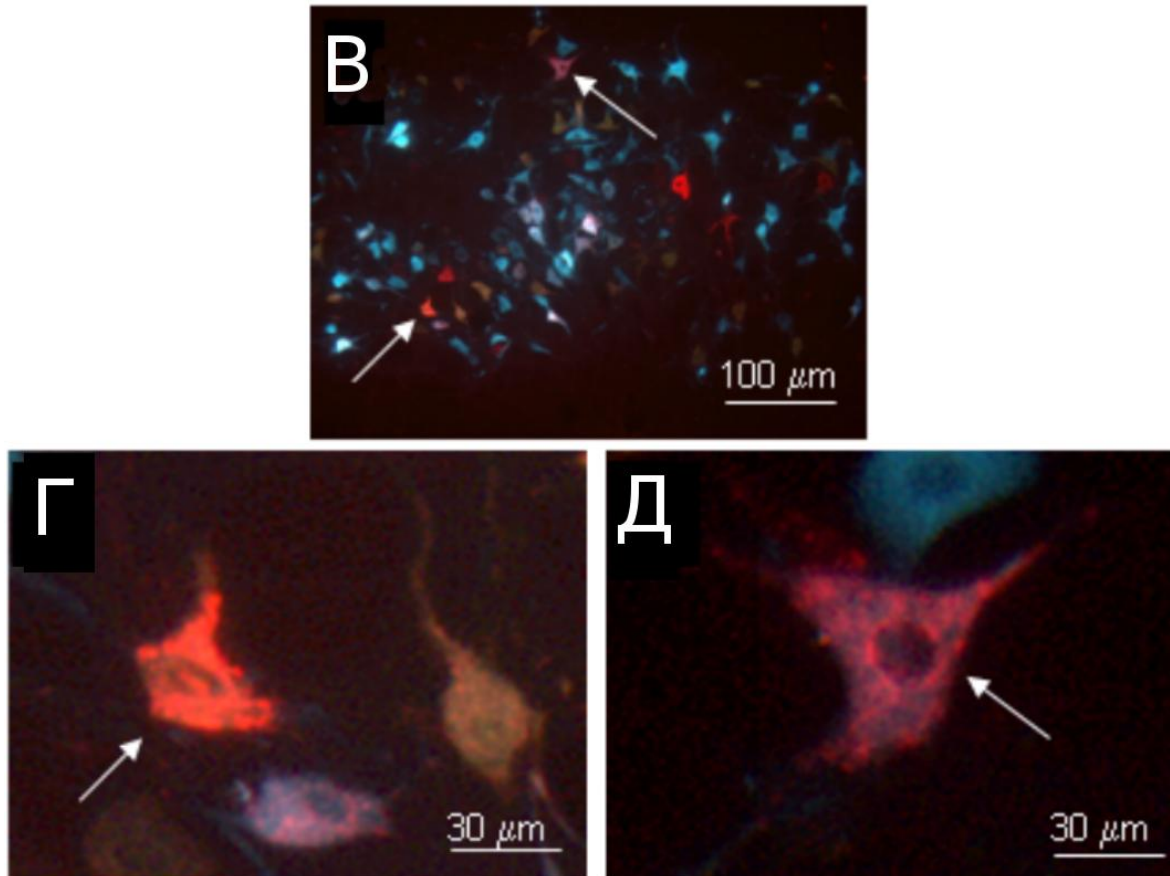
При животните, живеещи в обогатена среда в продължение на два месеца след операцията (дFFA+EE), се наблюдаваше възстановяване на ъгъла при максимална протракция до $76^\circ \pm 6^\circ$, но амплитудата на движенията - $26^\circ \pm 5^\circ$, и ъгловата скорост по време на протракцията - $490^\circ/\text{sec} \pm 187^\circ/\text{sec}$, показаха снижение с около 60% в сравнение със същите показатели при здравите животни. (Фиг. 1)

Степента на колатерално аксонално разклоняване остава висока независимо от стимулацията.

Моделът на проекция на моторните аксони от ядрото на лицевия нерв към различните му моторни клончета и степента на аксонално разклоняване бяха оценени с помощта на тройно ретроградно маркиране. При здрави животни мотоневроните, които изпращат аксони към *ramus zygomaticus*, *buccalis* и *marginalis* се локализират съответно в дорзалното, латералното и междинното подядро на лицевия нерв. В ядрото на интактния лицев нерв бяха изброени средно 2184 ± 242 маркирани мотоневрони, проектиращи съответно в: *r. zygomaticus* – 364 ± 47 ; *r. buccalis* – 1441 ± 101 и *r. marginalis mandibulae* – 379 ± 94 . Двойно и тройно маркирани тела на неврони не бяха наблюдавани, тъй като интактните мотоневрони изпращат само по един неразклонен аксон към съответния клон на лицевия нерв (Фиг. 2 А).



Фигура 2: Миотопична организация на моторното ядро на лицевия нерв демонстрирана на 50 микрометрови вибраторни срезове. Едновременната апликация на Dil (червено), FG (жълто) и FB (синьо) съответно върху *r. zygomaticus*, *r. buccalis* и *r. marginalis mandibulae* оцветява ясно различни подядра в ядрото на интактния лицев нерв без да е налице припокриване на маркери (А). Два месеца след прекъсване и анастомоза на лицевия нерв миотопичната организация от страната на операцията е загубена (Б) независимо дали животните са стимулирани или не.

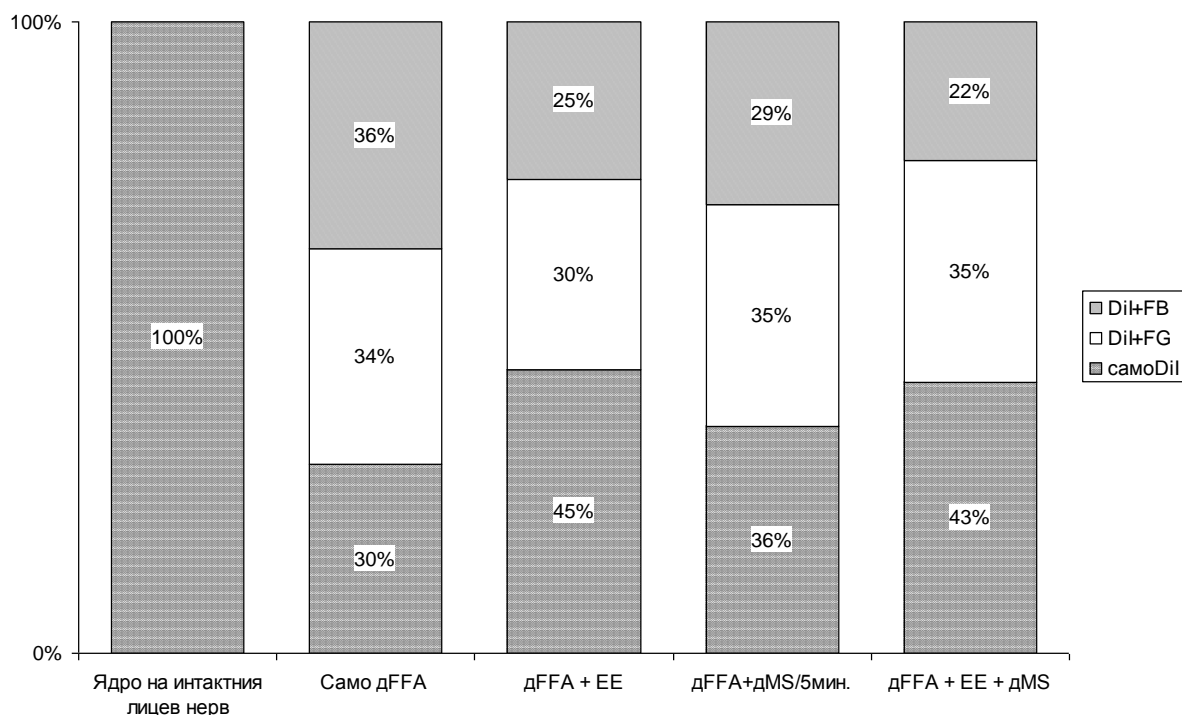


Фигура 2 (Продължение): Двойно маркирани тела на мотоневрони след FFA (стрелки в B) са по-ясно различими на 15 микрометровите срезове и при по-голямо увеличение. Цитоплазмата на мотоневрона показан на панел „Г“ съдържа едновременно DiI и FG, а този на панел „Д“ - едновременно DiI и FB.

Така индексът на аксонално разклоняване в ствола на интактния лицев нерв, изчислен въз основа мотоневроните проектиращи своите аксони в *r. zygomaticus*, е **0%** (Фиг. 3).

След увредата на лицевия нерв миотопичната организация на ядрото на лицевия нерв в ясно видими подядра бе нарушена при всички експериментални групи независимо от последващото третиране. Всички ретроградно маркирани неврони бяха разпръснати из цялото ядро (Фиг. 2 Б). Освен нарушената миотопична организация се наблюдаваха и двойно или тройно маркирани тела на неврони (Фиг. 2 Г-Е).

Прерязването и зашиването на лицевия нерв драматично повлияваше състава и количеството на маркираните от нас клонове на лицевия нерв. Общият брой ретроградно маркирани мотоневрони при дFFA-третиране животни нарастна съответно до **3609 ± 698** след дFFA без последващо третиране, **5563 ± 841** при групата, живееща в обогатена среда след хирургичната интервенция (дFFA+EE), **6052 ± 745** при животните, подложени на дMS след дFFA (дFFA+дMS) и до **5127 ± 820** при групата, подложена на дFFA и последваща дMS и отглеждане в обогатена среда (дFFA+EE+дMS). Това нарастване се дължи на значително увеличаване на



Фигура 3: Дял на мотоневроните проектиращи само в *r. zygomaticus* на *n. facialis* (маркирани с DiI), и едновременно в *r. zygomaticus* и *r. buccalis* (двойно маркирани с DiI и Fluorogold; DiI+FG) и в *r. zygomaticus* и *r. marginalis mandibulae* (двойно маркирани с DiI и Fast Blue; DiI+FB). Два месеца след хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв (дFFA) не се наблюдава съществени различия в колатералното аксонално разклоняване в мястото на увредата: дFFA - нестимулирани след увредата животни; дFFA+EE – животни, стимулирани чрез обогатена среда за живот; дFFA+дMS – животни, стимулирани чрез мануална стимулация на мустачковата мускулатура; дFFA+EE+MS – животни, подложени на комбинирана стимулация.

броя на единично маркираните с FluoroGold и FastBlue мотоневрони. Сврѣхбройните неврони най-вероятно са такива, които при интактните животни проектират към *r. auricularis posterior* и *r. coli* на *n. facialis* и чрез аксонални колатерали са поели ретроградния маркер. Тѣй като тези клонове на лицевия нерв не са маркирани при контролната група, мотоневроните, от които произхождат техните аксони, не са преброени. След прекъсването на нервния ствол колатералите, произхождащи от аксони проектиращи първоначално в *r. auricularis posterior* и *r. coli*, веоятно са прорастнали в някой от маркираните клонове на лицевия нерв (*rr. buccalis* или *marginalis mandibulae*).

Количественият състав на маркираните клонове на лицевия нерв при различните експериментални групи се измени както следва:

- а. При групата, подложена само на десностранна дFFA, мотоневроните проектиращи в *r. zygomaticus* бяха средно 709 ± 178 ; в *r. buccalis* – 1908 ± 289 и в *r. marginalis mandibulae* – 1488 ± 356 .

- b. При групата, живееща в обогатена среда след FFA (дFFA+EE), в *r. zygomaticus* проектираха средно 465 ± 234 мотоневрони; в *r. buccalis* – 2871 ± 268 и в *r. marginalis mandibulae* – 2484 ± 409 .
- c. При групата, подложена на дMS за 5 минути дневно в продължение на два месеца (дFFA+дMS за 5 мин) – в *r. zygomaticus* - средно 756 ± 251 ; в *r. buccalis* – 3162 ± 342 и в *r. marginalis mandibulae* – 2614 ± 184 .
- d. При групата, подложена на дMS и живееща в обогатена среда след дFFA (дFFA+дMS+EE) - в *r. zygomaticus* - средно 810 ± 256 ; в *r. buccalis* – 2790 ± 432 и в *r. marginalis mandibulae* – 1986 ± 210 .

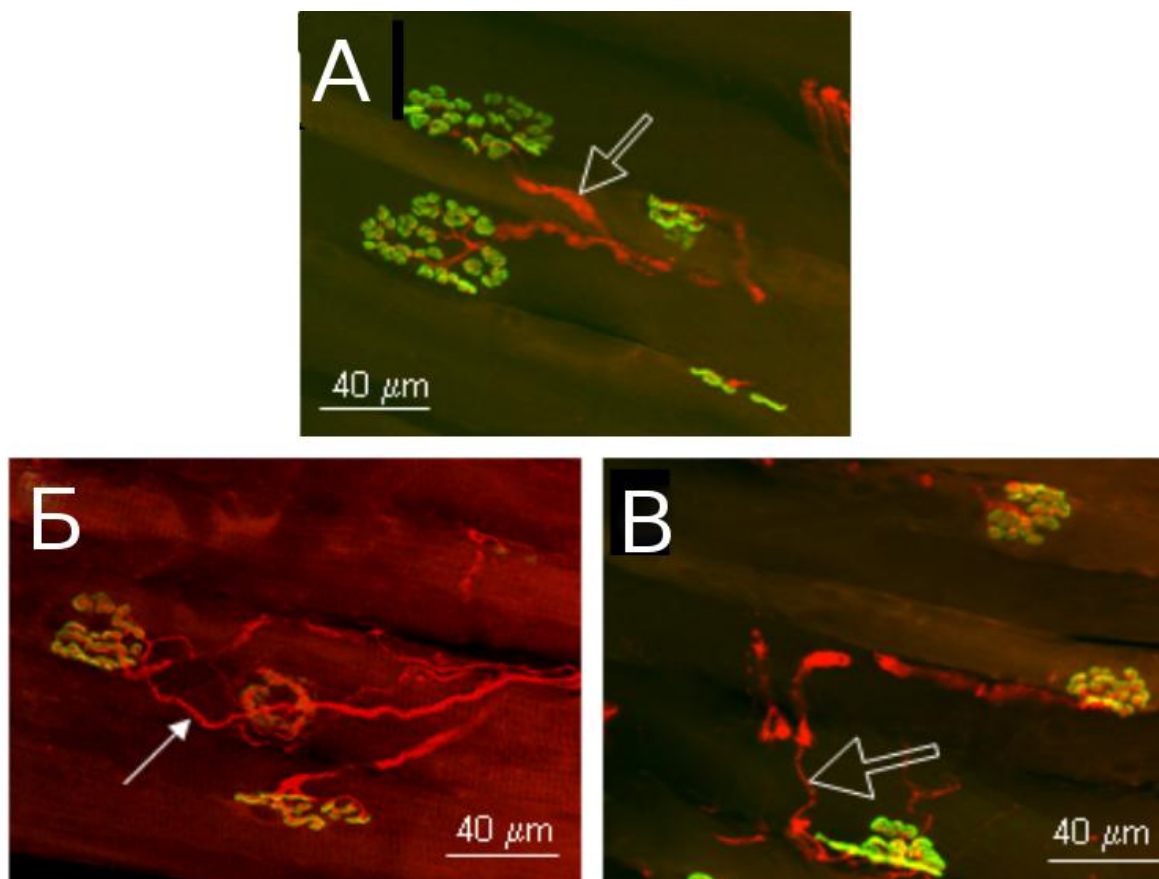
Количественото оценяване на колатералното аксонално разклоняване се осъществи чрез процентния дял на двойномаркираните мотоневрони, проектиращи в *r. zygomaticus* (DiI+FB и DiI+FG). При животните подложени на дFFA без последващо третиране общо около **70%** от проектиращите в *r. zygomaticus* мотоневрони бяха двойно маркирани. При останалите групи този индекс на аксоналното разклоняване остана висок независимо от вида на третирането: при група дFFA+EE двойно маркирани бяха **55%** от мотоневроните проектиращи в *r. zygomaticus*, при дFFA+дMS - **64%**, а при дFFA+EE+дMS – **57%** (Фиг. 2, 3).

Никой от методите за стимулация (мануална, чрез околната среда или комбинирана) нямаше значимо влияние върху наблюдаваните модели на проекция, т.е. след прекъсване и възстановяване на лицевия нерв винаги се наблюдава пълна загуба на миотопичната организация, увеличен общ брой на проектиращите мотоневрони и съществено нарастване в индекса на колатералното аксонално разклоняване, независимо дали животните са подложени на някой от методите за стимулация (Фиг. 2, Фиг. 3).

Мануалната стимулация понижава степента на полиинервация на моторните плочки.

При по-нататъшното проучване ние изследвахме моделите на реинервация в периферията, т.е. на нивото на мускулните влакна на един от вибрисните мускули – *m. levator labii superioris*. При контролните животни бяха изброени около 1543 ± 132 моторни плочки в *m. levator labii superioris* като всички бяха моноинервирани (Фиг. 4 А). След прерязване и зашиване на лицевия нерв не бяха установени значими различия в общия брой на моторните плочки. При животните подложени на дFFA без последващо третиране бяха преброени средно 1326 ± 413 , при дFFA+EE - 1411 ± 441 , при дFFA+дMS – средно 1640 ± 338 , при дFFA+EE+дMS – средно 1345 ± 319 , при дFFA+лMS – средно 1237 ± 249 и при дFFA+TK – 1402 ± 235 .

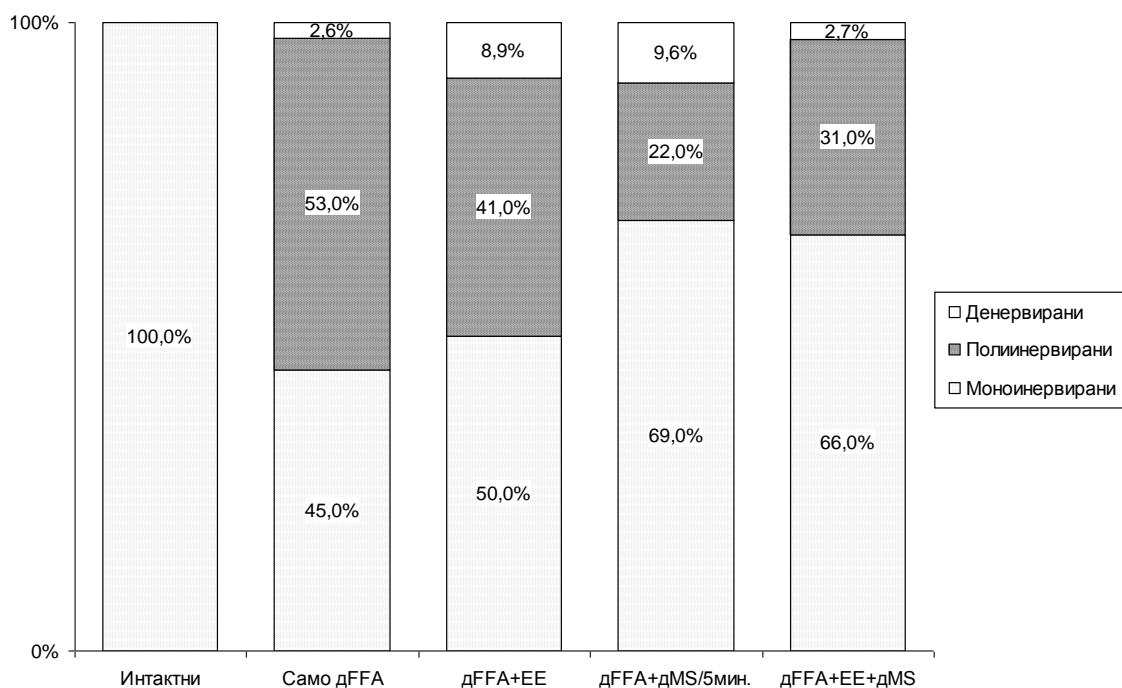
За разлика от общия брой моторни плочки качеството на реинервация на *m. levator labii superioris* показваше значителни различия в зависимост от начина на третиране след оперативната интервенция.



Фигура 4: Качество на мускулната реинервация. Насложени серии от конфокални образи на моторни плочки в *m. levator labii superioris* на интактни плъхове (А), след прекъсване и край-в-край анастомоза на лицевия нерв (FFA) без последваща стимулация (Б) и след мануална стимулация (FFA+MS; В). Три аксонални клончета (стрелка в Б) преминават границите на полиинервираната моторна плочка показана на панел „Б“. Напротив моноинервираните моторни плочки са достигани от единичен аксон (празните стрелки в А и В) с няколко претерминални клончета. И в трите примера цялата моторна плочка се съдържа в конфокалната серия. Снимките са адаптирани от Guntinas-Lichius et al., 2005.

Два месеца след прекъсване и зашиване на лицевия нерв без последващо третиране в мускула се наблюдаваше видимо увеличен брой, преплитащи се и разклоняващи се аксонални клончета (хиперневротизация) и нарушена реинервация с поява на аномални моторни плочки, а диаметърът на мускулните влакна беше видимо по-малък.

При част от моторните плочки не се наблюдаваше в нито един срез видимо аксонално разклонение (маркирано с анти-β-тубулин от невронален клас III), което да навлиза в границите на моторната плочка (маркирана с α-бунгаротоксин), и бяха класифицирани като денервирани. При други се забелязваше повече от едно аксонално разклонение което преминава границите на моторната плочка и бяха обозначени като полиинервирани (Фиг. 4 Б).



Фигура 5: Съотношение между моно-, поли- и денервирани моторни плочки в *m. levator labii superioris*. Два месеца след FFA съотношението между поли- и моноинервирани моторни плочки беше приблизително 1:1 при всички животни, които не бяха подложени на същестранна стимулация на вибрисните мускули. За разлика от тях при всички животни третирани със същестранна MS съотношението поли- към моноинервирани моторни плочки в реинервирания мускул беше около 0,3:1, т.е. изместено в полза на моноинервираните моторни плочки: дFFA - нестимулирани след увредата животни; дFFA+EE – животни, стимулирани чрез обогатена среда за живот; дFFA+дMS – животни, стимулирани чрез мануална стимулация на мустачковата мускулатура; дFFA+EE+MS – животни, подложени на комбинирана стимулация.

Изброяването на всички моно-, поли- и денервирани моторни плочки позволи количествено да се оценят и сравнят аномалиите в реинервацията при различните групи животни. Два месеца след дFFA без последващо третиране около **53%** от моторните плочки са полиинервирани, **2,6%** са денервирани и само около **43%** са моноинервирани (Фиг. 5).

Ежедневната мануална стимулация с продължителност 5 минути (дFFA+дMS за 5 мин/ден) значително снижава процента на полиинервирани моторни плочки (около **22%** два месеца след операцията). Това снижение е за сметка на нарастване на дела както на моноинервираните (до около **69%**), така и на денервираните (до около **9,6%**) моторни плочки. За разлика от нея стимулацията с обогатена среда (дFFA+EE) няма съществен ефект върху дела на моноинервираните (около **50%**) и полиинервираните (около **41%**) моторни плочки, но се наблюдава растеж в дела на денервираните моторни плочки (до около **8,9%**).

Комбинацията от двата метода (дFFA+EE+дMS) има междинен ефект, като дела на полиинервираните моторни плочки намалява до около **31%**, а този на моноинервираните се покачва до около **66%**. Делът на

денервираните моторни плочки в *m. levator labii superioris* при тази група животни оставаше около **2,7%**. Както контралатералната стимулация (дFFA+лMS; **38% моноинервирани, 60% полиинервирани и 2% денервирани**) така и тактилния контакт без стимулация (дFFA+ТК; **39% моноинервирани, 57% полиинервирани и 5% денервирани**) нямаха съществен ефект върху типа реинервация на моторните плочки. Така съотношението между поли- и моноинервирани моторни плочки два месеца след дFFA без стимулация е около **1,2: 1** (Фиг. 5), а след двумесечна мануална стимулация на мустачковите възглавничка от страната на увредата (дFFA+дMS) – около **0,32:1**, т.е дMS понижава това съотношение до 4 пъти в сравнение с нестимулирани плъхове и до ниво, което статистически не се отличава от интактните животни (Фиг. 5).

Мануалната стимулация противодейства умерено на следтравматичната загуба на положителни за синаптофизин аксонни терминали във ядрото на лицевия нерв.

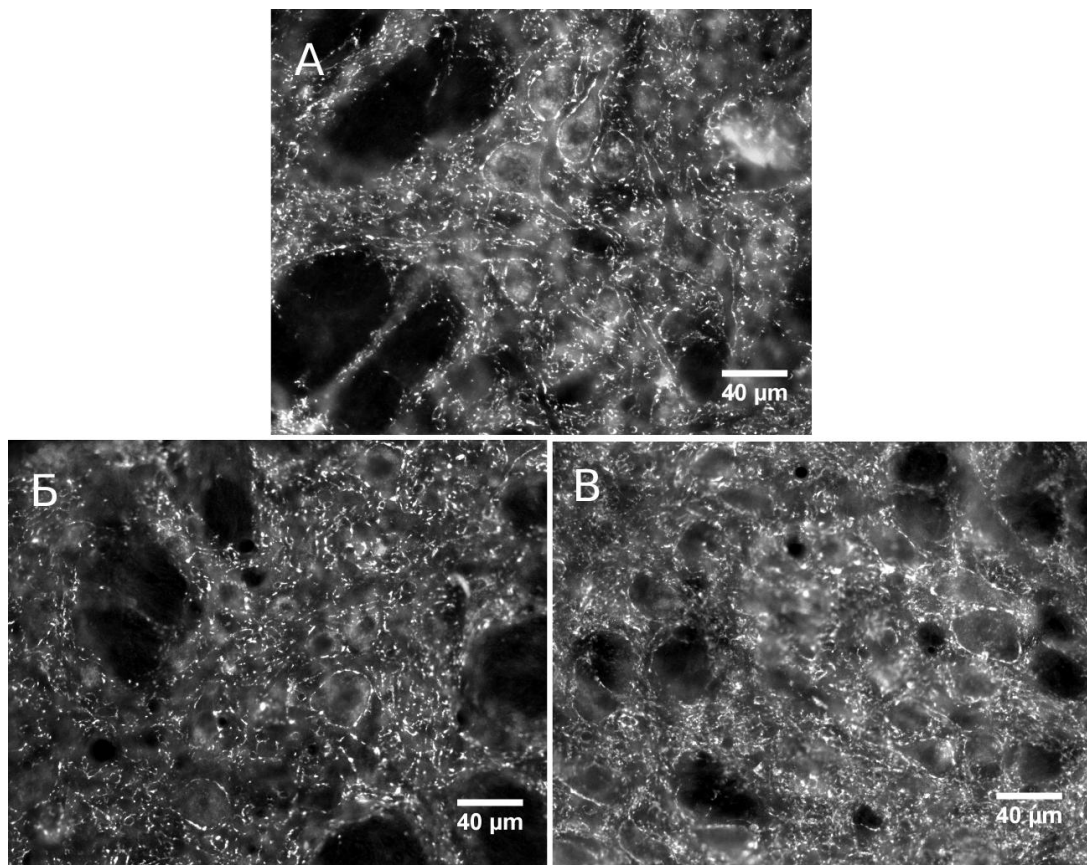
За оценка на синаптичния вход към ядрото на лицевия нерв при плъхове, подложени на дFFA със и без последваща стимулация, бяха околичествени нивата на синаптофизин (утвърден маркер за пресинаптичните терминали) с помощта на дигитални образи в сивата скала и дензитометричен подход. Образите бяха заснети на епифлуоресцентен микроскоп от срезове, оцветени със силно разрежено (1:4000) антитяло срещу синаптофизин. Този протокол позволява получаването на образи, в които по подобие на конфокалните оптични срезове, пресинаптичните терминали се визуализират като множество ясно различими точки в невропила и около телата на невроните (Фиг. 6).

Общият синаптичен вход към ядрото на лицевия нерв се оценяваше върху образи от еквилидистантни срезове през латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв в моста. В латералното подразделение на ядрото на интактния лицев нерв бяха изброени средно **2863 ± 587** синаптофизин-положителни профила за един образ (площ на образа = 85732,74 μm²), а обемната фракция на синаптофизин положителните частици възлизаше средно на **9,98% ± 2,36%** (Фиг. 6, Фиг. 7).

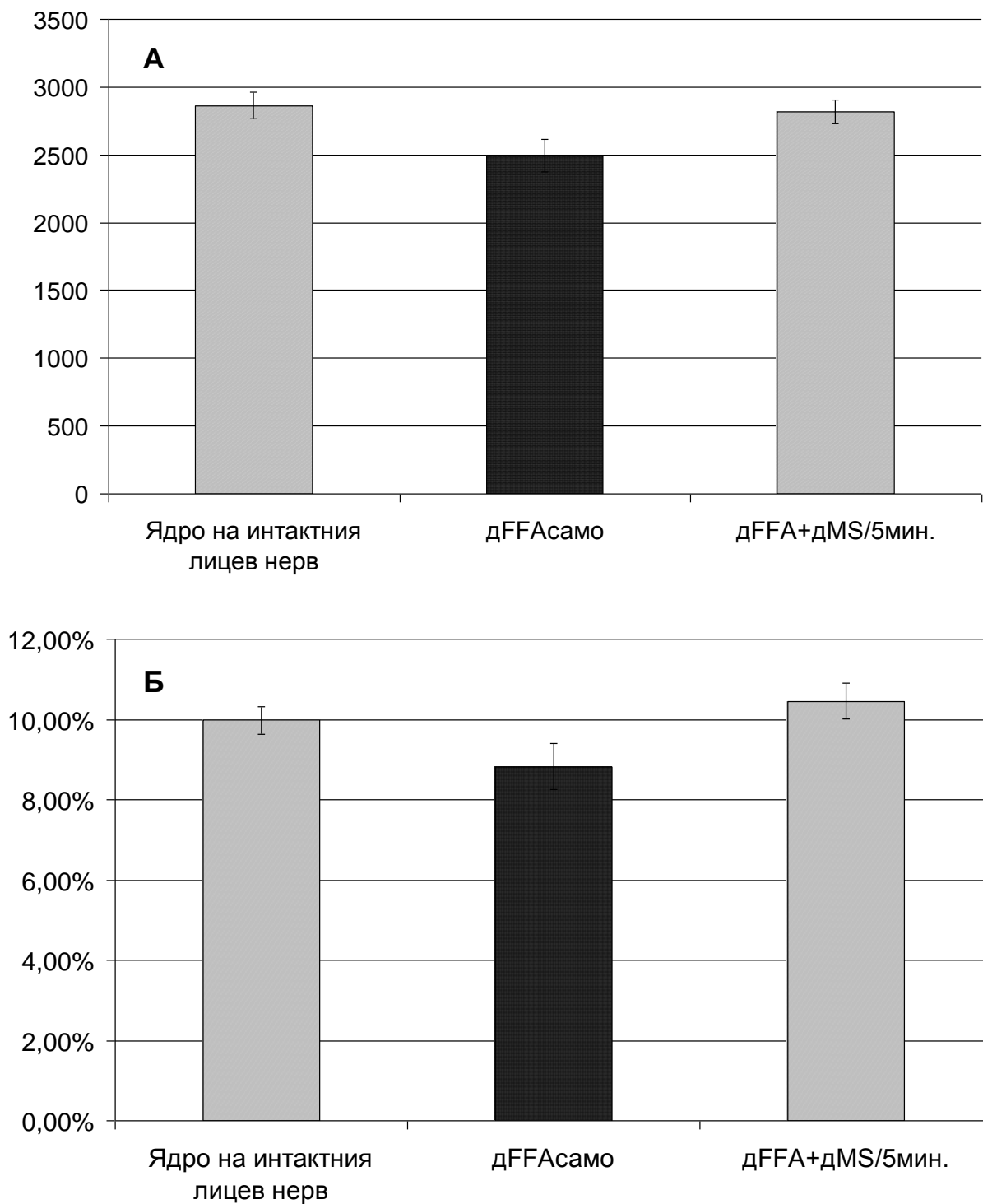
При животните, подложени само на прекъсване и зашиване на лицевия нерв бе наблюдавано статистически значимо снижение на средния брой на профилите в един образ - **2496 ± 540** (**p<0,001**, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni), и на обемната фракция - до **8,82% ± 2,41%** (**p=0,002**, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni).

При стимулираните животни показателите както за средният брой на синапсите в образите от ядрото на оперирания лицев нерв (**2818 ± 543**), така и за обемната фракция (**10,46% ± 2,39%**), бяха близки до тези от контралатералното ядро, но по-високи отколкото при нестимулирани животни (**p<0,001**, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) (Фиг. 6, Фиг. 7 А, Б).

За оценка на индивидуалния аксосоматичен вход към мотоневроните на лицевия нерв в околност от 4 μm на случайно подбрани перикариони от ядрото на лицевия нерв бяха изброени перисоматичните синаптофизин-положителни профили с презумпцията, че голяма част от тях представляват аксосоматични или проксимални аксодендритни синапси. В ядро на интактния лицев нерв бяха преброени средно 23 ± 8 перисоматични профила за неврон. Този брой намалява до 20 ± 7 ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) при животните подложени само на FFA. След MS броят на перисоматичните „синапси“ се възстановява до 22 ± 8 , като различията с нестимулираните животни са статистически достоверни ($p = 0,012$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni).



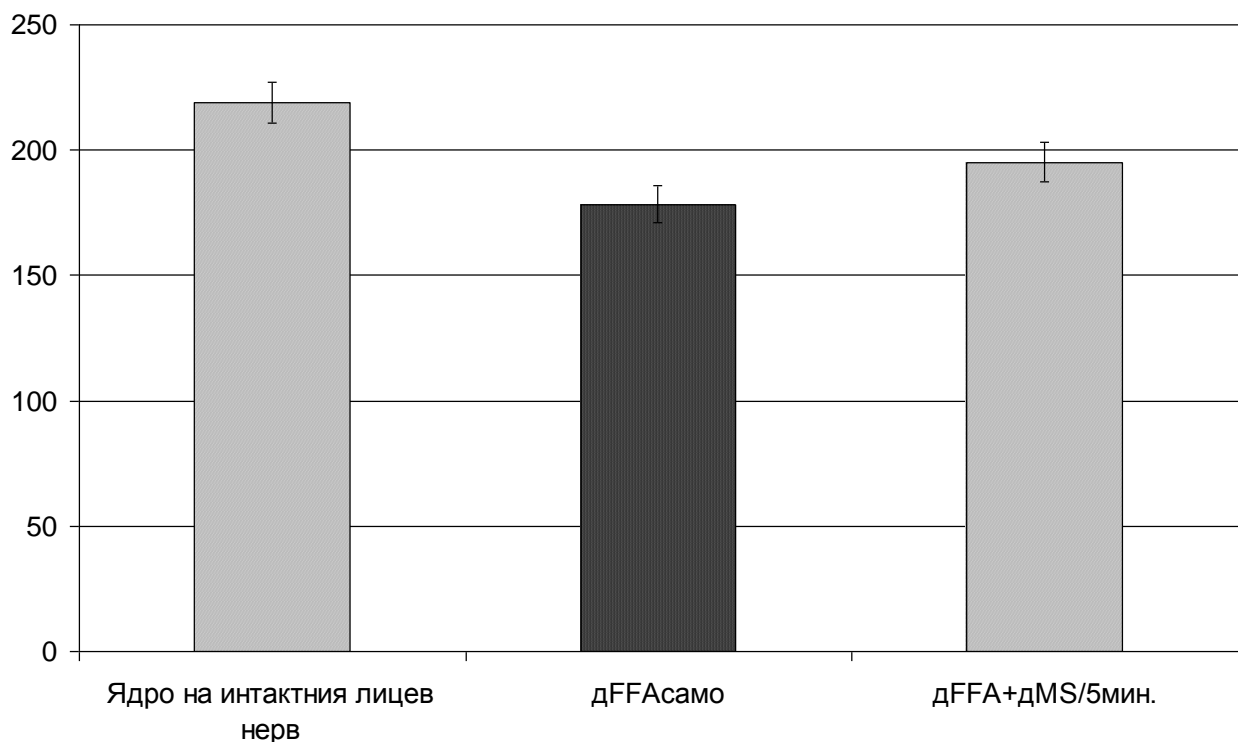
Фигура 6: Синаптофизинова активност в латералното подразделение на ядрото на интактния лицев нерв (А) и в ядрото на оперирания лицев нерв два месеца след FFA без последваща стимулация (Б) и два месеца след FFA и последваща MS на вибрисната мускулатура от страната на увредата (В). Пресинаптичните терминали се визуализират като множество ясно различни точки в невропила и около телата на невроните. Отпечатаните снимки са с модифициран контраст.



Фигура 7: А. Среден брой синаптични профили на поле ($85732,74 \mu\text{m}^2$) от латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв при плъхове, два месеца след FFA без последваща стимулация (dFFA) и след ежедневна MS на същестранната мустачкова мускулатура (dFFA+dMS). Б. Обемна фракция на синаптофизина в латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв при плъхове, два месеца след FFA без последваща стимулация (dFFA) и след ежедневна MS на същестранната мустачкова мускулатура (dFFA+dMS).

За да се изгладят различията, дължащи се на различния размер на перикарионите, броя перисоматични частици беше претеглен с периметъра на съответния перикарион, като по този начин получихме данни за средната линейна плътност на перисоматичните синаптични профили (брой синапси/1mm от периметъра; mm^{-1}). В ядрото на контралатералния интактен лицев нерв средната линейна плътност на перисоматичните синапси възлиза на $219,09 \text{ mm}^{-1} \pm 59,25 \text{ mm}^{-1}$. След оперативната интервенция този показател намалява до $178,42 \text{ mm}^{-1} \pm 53,84 \text{ mm}^{-1}$ ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni), а след MS се възстановява до $195,04 \text{ mm}^{-1} \pm 56,89 \text{ mm}^{-1}$ ($p = 0,01$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni). Тези стойности са близки, но не достигат тези в ядрото на интактния лицев нерв ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) (Фиг. 6, Фиг. 7 В).

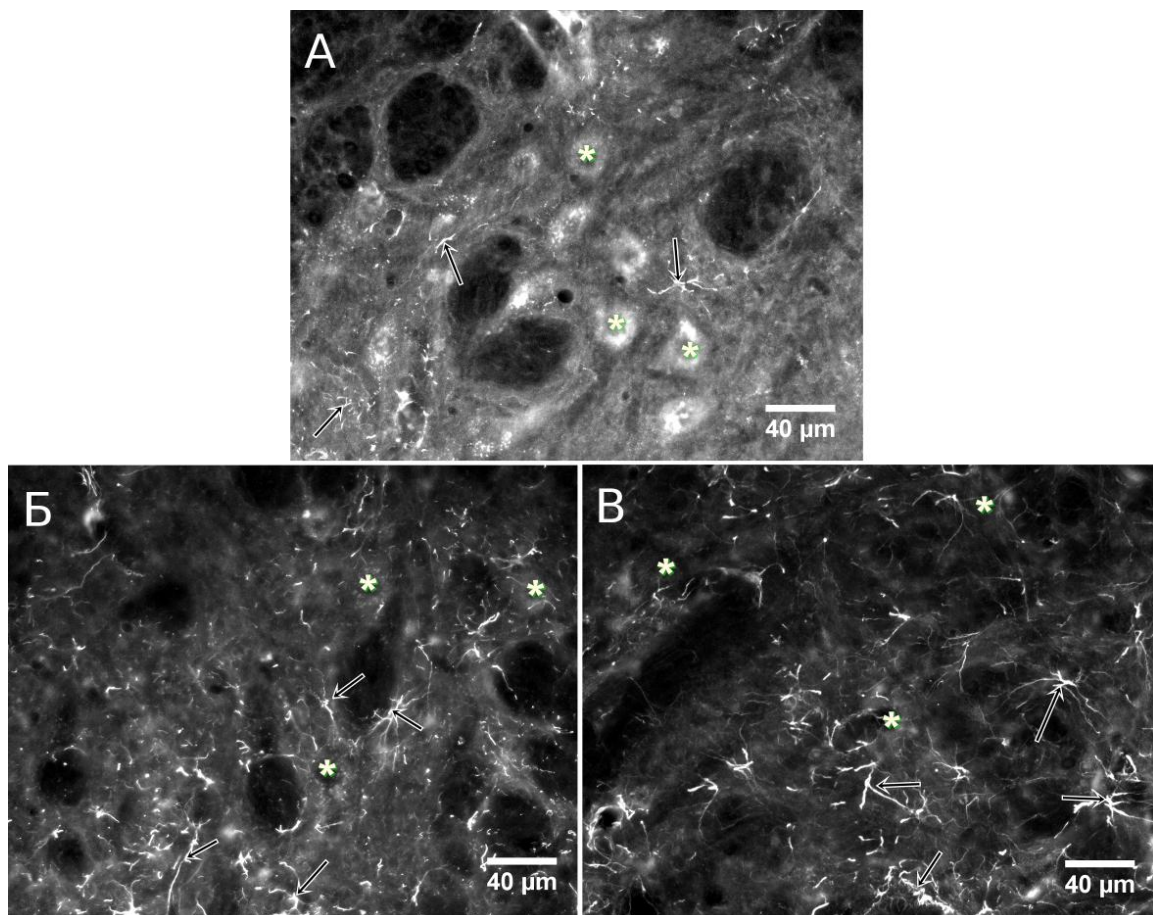
Тези съществени различия в линейната плътност на синапсите на фона на почти нищожни разлики в броя на перисоматичните синапси, вероятно се дължат на нарастването на средния периметър на невроните след оперативната интервенция – от $106,05 \mu\text{m} \pm 19,74 \mu\text{m}$ в ядрото на интактния лицев нерв до съответно $114,04 \mu\text{m} \pm 25,62 \mu\text{m}$ в ядрото на оперирания лицев нерв при нестимулираните ($p = 0,002$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) и $114,95 \mu\text{m} \pm 23,93 \mu\text{m}$ при подложените на дMS ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni).



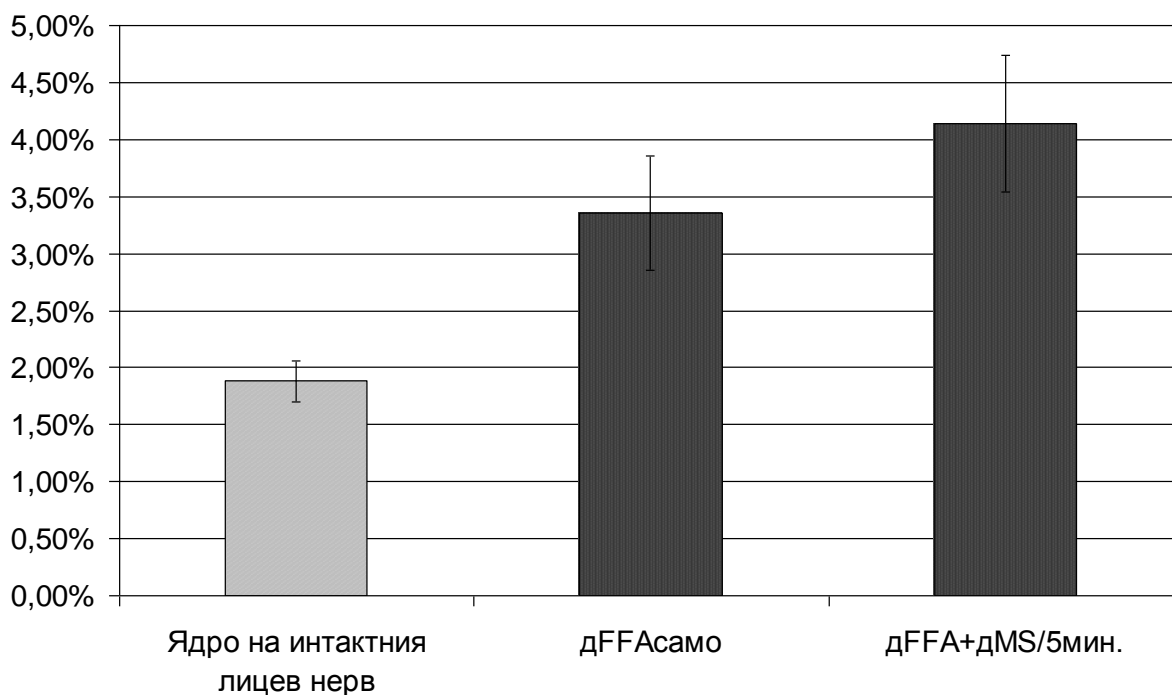
Фигура 7 (продължение): В. Средна линейна гъстота на перисоматичните синапси по периметъра на лицевите мотоневрони при плъхове, два месеца след FFA без последваща стимулация (дFFA) и след ежедневна MS на същестранната мустачкова мускулатура (дFFA+дMS).

Количеството GFAP в ядрото на лицевия нерв остава трайно повишено независимо от приложението на мануална стимулация.

Астроцитната реакция в ядрото на лицевия нерв беше изследвана като явление съпровождащо промените настъпващи в синаптичния вход непосредствено след периферната аксотомия. С помощта на GFAP имунофлуоресценция в латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв 2 месеца след прекъсване и зашиване на лицевия нерв, както при подложените на мануална стимулация животни, така и при нестимулираните бе установена умерена изоморфна астроглиоза (Фиг. 8).



Фигура 8: GFAP активност в латералното подразделение на ядрото на интактния лицев нерв (А), и в ядрото на оперирания лицеев нерв два месеца след FFA без последваща стимулация (Б) и два месеца след FFA и последваща MS на вибрисната мускулатура от страната на увредата (В). В контралатералното ядро (А) реакцията е слабо изразена и израстъците на астроцитите (стрелки) са къси и слабо разклонени. В ядрото от страната на увредата както при нестимулирани (Б), така и при стимулирани животни (В) се забелязва умерена изоморфна астроглиоза, като астроцитните израстъци са по-дълги и силно разклонени и показват подчертана асоциация с телата на мотоневроните (звездички). Астроцитната реакция при стимулираните животни е малко по-силно изразена, вероятно като израз на по-интензивно протичащи процеси на ремоделиране.



Фигура 9: Обемна фракция на GFAP в латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв при плъхове, два месеца след FFA без последваща стимулация (дFFA) и след ежедневна MS на същестранната мустачкова мускулатура (дFFA+дMS). Налице е значително нарастване в активността на GFAP два месеца след операцията. Астроцитната реакция при стимулираните животни е малко по-силно изразена, вероятно като израз на по-интензивно протичащи процеси на ремоделиране.

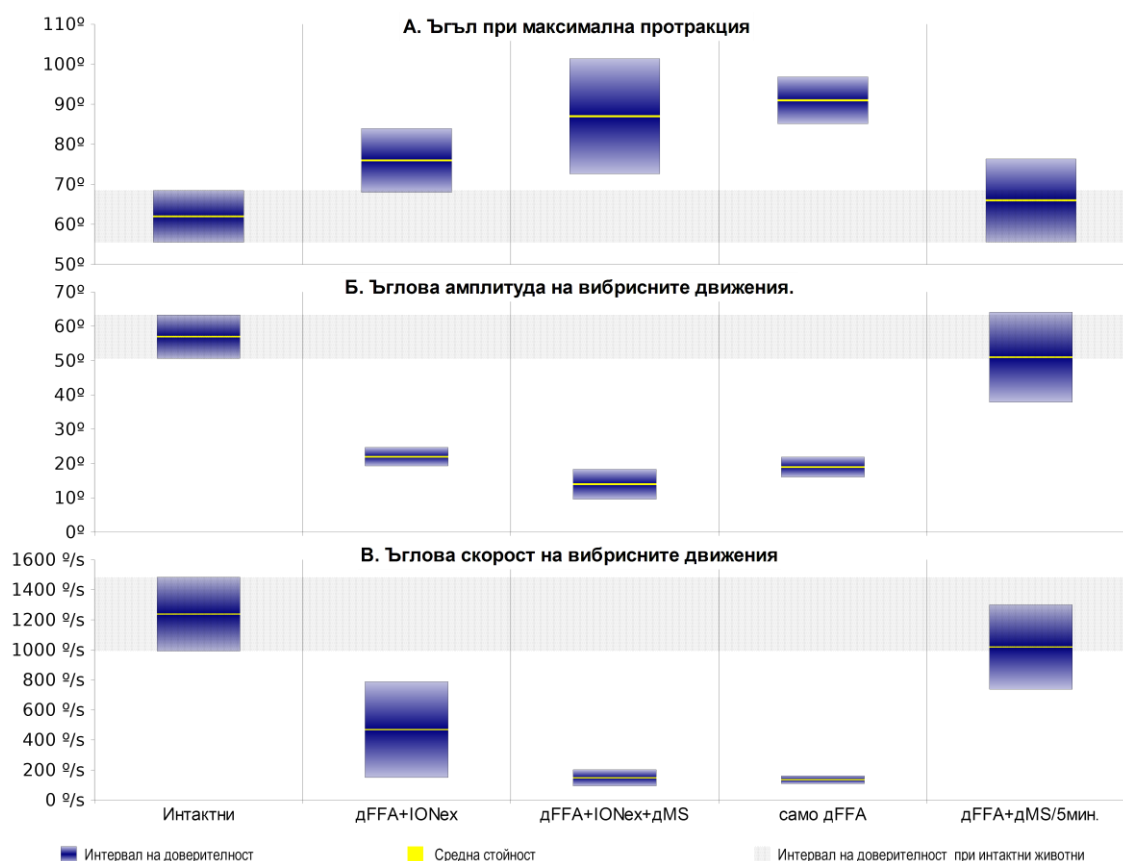
Околичествяването на тази реакция бе постигнато чрез измерването на обемната фракция на GFAP позитивната активност в изследвания обем. В ядро на интактния лицев нерв GFAP заема около **1,88% ± 0,87%** от изследвания обем (Фиг. 9).

В ядрото на оперирания лицев нерв количеството му нараства близо два пъти съответно до **3,35% ± 1,6%** при нестимулираните животни ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) и **4,13% ± 2,2%** при подложените на мануална стимулация ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni). Налице е и слабо изразено статистически значимо повишение на количеството GFAP (нарастване от около 20%; $p < 0,05$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) при животните подложени на дMS в сравнение с нестимулираните (Фиг. 9).

Подпомогнатото чрез мануална стимулация възстановяване на двигателна активност след увреда на лицевия нерв изисква интактни сетивни пътища

Мануалната стимулация влошава вибрисната функция след премахване на тригеминалните аференти.

Както вече бе споменато при интактни плъхове ъгълът при максимална протракция е около $62^\circ \pm 13,2^\circ$, амплитудата на движенията от максимална протракция до максимална ретракция съответно е $57^\circ \pm 13^\circ$, а ъгловата скорост по време на протракция – около $1238^\circ/\text{sec} \pm 503^\circ/\text{sec}$. Честотата на маховете при плъховете от всички експериментални групи бе около **7 Hz**. (Фиг. 10).



Фигура 10: Анализ на вибрисната двигателна функция два месеца след едновременно хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв и екстирпация на подочничния нерв (dFFA+dIONex). Показателите са представени чрез средната им стойност (жълта линия) в рамките на интервала на доверителност ($p \leq 0,05$; син стълб). Аблацията на сетивната обратна връзка възпрепятства възстановяването на вибрисната двигателна функция до нивата, измерени преди увредата (сиво засенчване), а MS при тези условия допълнително влошава функционалното възстановяване. Адекватно възстановяване се наблюдава само при животни, подложени на MS от страната на изолирана моторна увреда.

След дFFA без последваща стимулация възстановяването бе лошо. Въпреки че честотата на маховете бе близка до здравите животни, както амплитудата така и ъгловата скорост при протракция бяха редуцирани до съответно **33%** и **11%** от стойността си при здрави животни (**Фиг. 10**).

Мануалната стимулация след дFFA възстанови амплитудата и ъгловата скорост на вибрисните махове до съответно **90%** и **82%** от стойностите при здрави животни, което попадна в диапазона на амплитудата за здрави животни.

При животните със сензорна елиминация, които не бяха стимулирани (дFFA+IONex) **ъгълът при максимална протракция** варира около **76° ± 10°**, **амплитудата на движенията от максимална протракция до максимална ретракция** съответно е **22° ± 3,4°**, а **ъгловата скорост по време на протракция** – **469°/sec ± 400°/sec**. При животните с увреда на лицевия нерв и елиминиран сетивен вход мануалната стимулация (дFFA+IONex+дMS) не успява да възстанови вибрисната функция. При тази група животни **ъгълът при максимална протракция** остава голям – **87° ± 18°**. **Амплитудата на движенията** бе намалена до **14° ± 5,5°**, а **ъгловата скорост по време на протракция** – до **148°/sec ± 68°/sec**. Всъщност дMS в тази група доведе до влошаване на функцията с редукция на амплитудата на маховете и ъгловата скорост по време на протракцията до съответно **25%** и **12%** от стойностите при здрави животни. За разлика от последните при животни неподложени на стимулация (дFFA+IONex) тези показатели бяха снижени само до **39%** (за **амплитудата на движенията**) и **38%** (**ъглова скорост по време на протракцията**) от съответните им стойности при здрави животни, като тези разлики са статистически значими при $p \leq 0,05$ (ANOVA). (**Фиг. 10**).

Функционалният резултат съответства на качеството на реинервация на таргетните мускули.

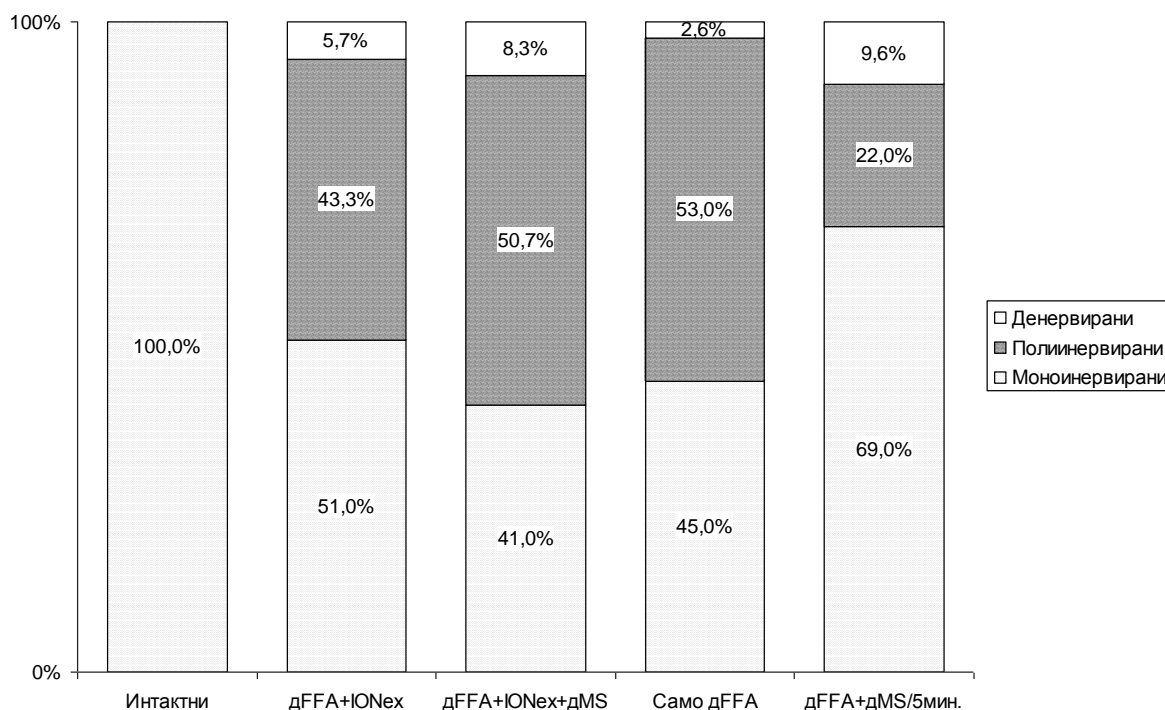
Качеството на реинервация на таргетните мускули отново беше оценявано в *m. levator labii superioris*. Качествените изследвания показаха две големи находки. В сравнение с плъховете подложени на дFFA+дMS, честотата на вътремускулни аксонални клончета беше по-висока, а диаметърът на мускулните влакна по-малък при плъхове подложени само на дFFA, дFFA+IONex и дFFA+IONex+дMS.

Тези качествени наблюдения съответстват на количествената оценка на вибрисната функция и степента на полиинервация на таргетните мускули.

Различните групи животни не показаха статистически значими различия в общия брой моторни плочки – при здравите контроли бяха изброени около **1543 ± 132** моторни плочки в *m. levator labii superioris*, като всички бяха моноинервирани; при животните подложени на дFFA без последващо третиране бяха преброени средно **1326 ± 413**, а при дFFA+дMS – средно **1640 ± 338**. Същото се наблюдаваше и при двете групи плъхове с едновременна лицева нервна увреда и сензорна елиминация – при

нестимулираните животни (дFFA+IONex) - 1495 ± 435 , а при подложените на мануална стимулация (дFFA+IONex+дMS) – 1579 ± 443 моторни плочки.

Качественият състав на моторните плочки отново се различаваше при различните експериментални групи. При подложените на дFFA без последващо третиране плъхове бяха изброени около **53% полиинервирани**, **2,6% денервирани** и само около **43% моноинервирани** моторни плочки. Подобна бе и картината, наблюдавана при дFFA+IONex – **43,3% полиинервирани**, **5,7% денервирани** и **51% моноинервирани** моторни плочки (Фиг. 11). За разлика от животните със интактна сетивна обратна връзка, при които дMS подобрява качеството на реинервация (дFFA+дMS – полиинервирани 22%, денервирани 9,6%, моноинервирани 69%), при животните с невъзстановима сензорна увреда (дFFA+IONex+дMS) стимулацията няма съществен ефект върху качествения състав на моторните плочки във вибрисната мускулатура – полиинервирани **50,7%**, денервирани – **8,3%**, и моноинервирани **41%** (Фиг. 11).



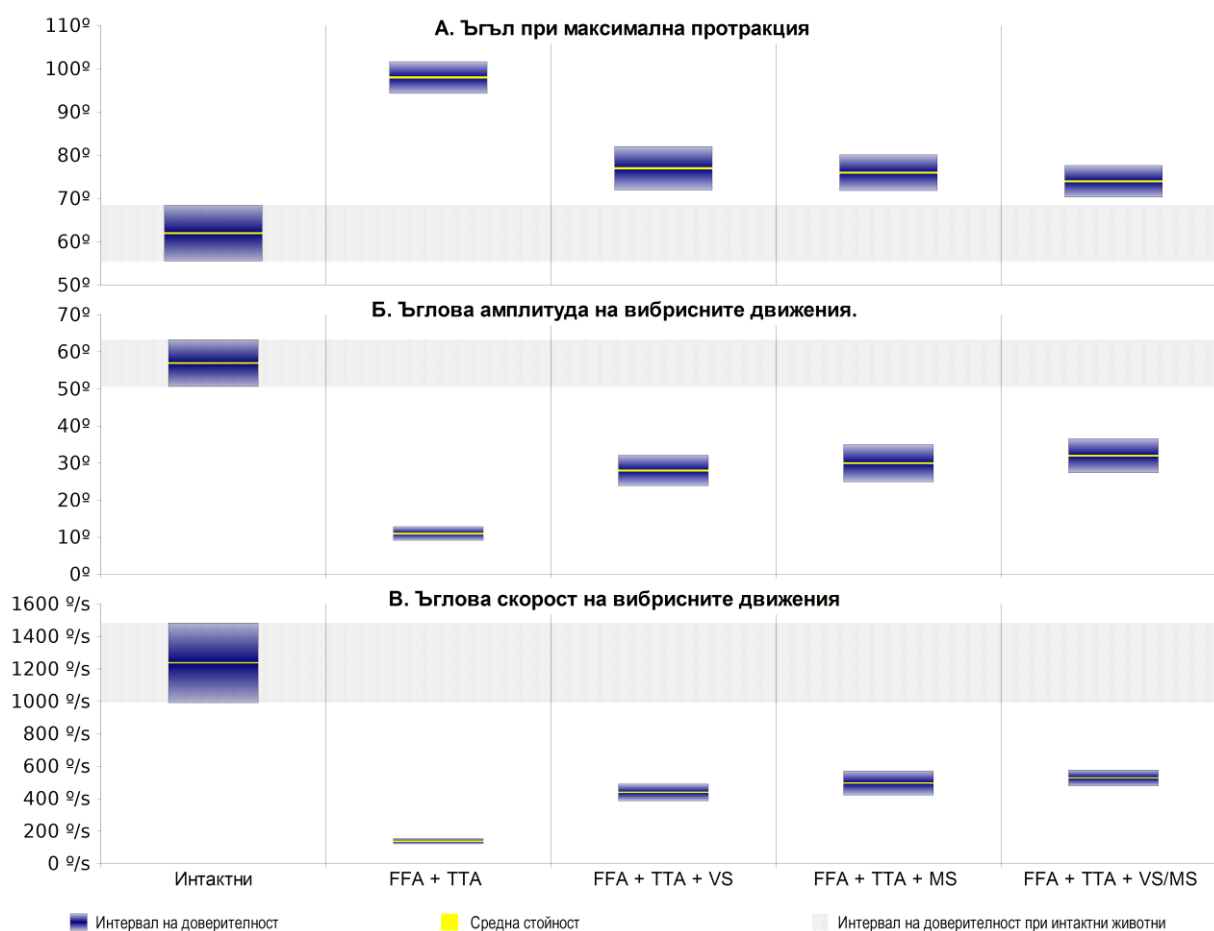
Фигура 11: Съотношение между моно-, поли- и денервирани моторни плочки в т. levator labii superioris два месеца след едновременно хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв и екстирпация на подочничния нерв (дFFA+дIONex). Съотношението между поли- и моноинервирани моторни плочки при нестимулираните животни беше приблизително 1:1 и не се измени съществено от приложението на същестранна MS (напротив наблюдаваше се нарастване на дела на полиинервираните моторни плочки) За разлика от тях животните с изолирана моторна увреда (дFFA) MS подобрява модела на реинервация, като измества съотношението в полза на моноинервираните моторни плочки (0,3:1).

Регенериращата сетивна обратна връзка затруднява, но не възпрепятства напълно възстановяването на двигателна активност след смесена нервна увреда (моторна и сензорна).

Мануалната стимулация и вибрисната сензорна стимулация подобряват вибрисната функция след комбинирано увреждане и възстановяване на лицевия и подочничния нерви.

В третата част от проучването изучихме влиянието на мануалната стимулация (дMS) върху възстановяването на вибрисната функция при положение, че е налице комбинирана (сетивна и двигателна) увреда и са създадени оптимални условия (хирургична анастомоза край-в-край, дFFA+ТТА) за регенерацията на нервите, инервиращи мустачковите възглавнички (*n. facialis* и *n. infraorbitalis*). Въз основа на резултатите от предходните експерименти и с намерението да оптимизираме сетивната обратна връзка, освен мануалната стимулация включихме в проучването и сензорен стимулационен протокол, а именно вибрисна сензорна стимулация (чрез премахване на контралатералните на увреждането вибриси, дVS). За по-добра яснота освен с интактни животни резултатите бяха сравнени и с контролна група подложена на изолирана моторна увреда и дMS в продължение на 4 месеца след операцията (дFFA+дMS за 4м). Четири месеца след комбинираното увреждане без последваща стимулация (дFFA+ТТА) вибрисната двигателна функция е силно увредена: **ЪГЪЛЪТ при максимална протракция варира около $98^{\circ} \pm 8^{\circ}$, амплитудата на движенията от максимална протракция до максимална ретракция съответно е $11^{\circ} \pm 4^{\circ}$, а ъгловата скорост по време на протракция – $138^{\circ}/\text{sec} \pm 37^{\circ}/\text{sec}$ (Фиг. 12).** Четири месеца след дFFA+ТТА и трите стимулационни протокола (дMS, дVS и дVS за 2 месеца, последвана от дMS за още 2 месеца) подобриха значително показателите на вибрисната двигателна функция.

При животните, подложени на вибрисна сензорна стимулация (дFFA+ТТА+дVS) **ЪГЪЛЪТ при максимална протракция намаляваше до $77^{\circ} \pm 11^{\circ}$, амплитудата на движенията от максимална протракция до максимална ретракция се повишаваше до $28^{\circ} \pm 9^{\circ}$, а ъгловата скорост по време на протракция - съответно до $439^{\circ}/\text{sec} \pm 113^{\circ}/\text{sec}$.** При другите експериментални групи се наблюдаваше подобрене на показателите от същия порядък: при дFFA+ТТА+дMS - **ЪГЪЛ при максимална протракция - $76^{\circ} \pm 9^{\circ}$, амплитуда на движенията - $30^{\circ} \pm 11^{\circ}$, ъглова скорост по време на протракцията - $497^{\circ}/\text{sec} \pm 163^{\circ}/\text{sec}$, а при дFFA+ТТА+дVS/дMS - **ЪГЪЛ при максимална протракция - $74^{\circ} \pm 8^{\circ}$, амплитуда на движенията - $32^{\circ} \pm 10^{\circ}$, ъглова скорост по време на протракцията - $528^{\circ}/\text{sec} \pm 107^{\circ}/\text{sec}$ (Фиг. 12).****



Фигура 12: Анализ на вибрисната двигателна функция четири месеца след едновременно хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв и на клончетата на подочничния нерв (дFFA+ТТА). Показателите са представени чрез средната им стойност (жълта линия) в рамките на интервала на доверителност ($p \leq 0,05$; син стълб). При стимулираните животни (независимо от начина на стимулация) е налице известно подобрение във функционалните показатели в сравнение с нестимулираните. Въпреки това уведената (макар и регенерираща) сетивна обратна връзка не позволява възстановяване до нивата, измерени преди увредата (сиво засенчване).

Измерените амплитуда и ъглова скорост на вибрисните движения са значително ($p \leq 0,05$, ANOVA с *post hoc* тест на Tukey) по-високи отколкото при нестимулираните животни (дFFA+ТТА). Въпреки подобрението наблюдавано в посочените показатели при стимулираните животни с комбинирана увреда на лицевия и подочничния нерв, както амплитудата на движенията, така и ъгловата скорост остават понижени съответно до около 50% и 40% от стойността им при здравите животни.

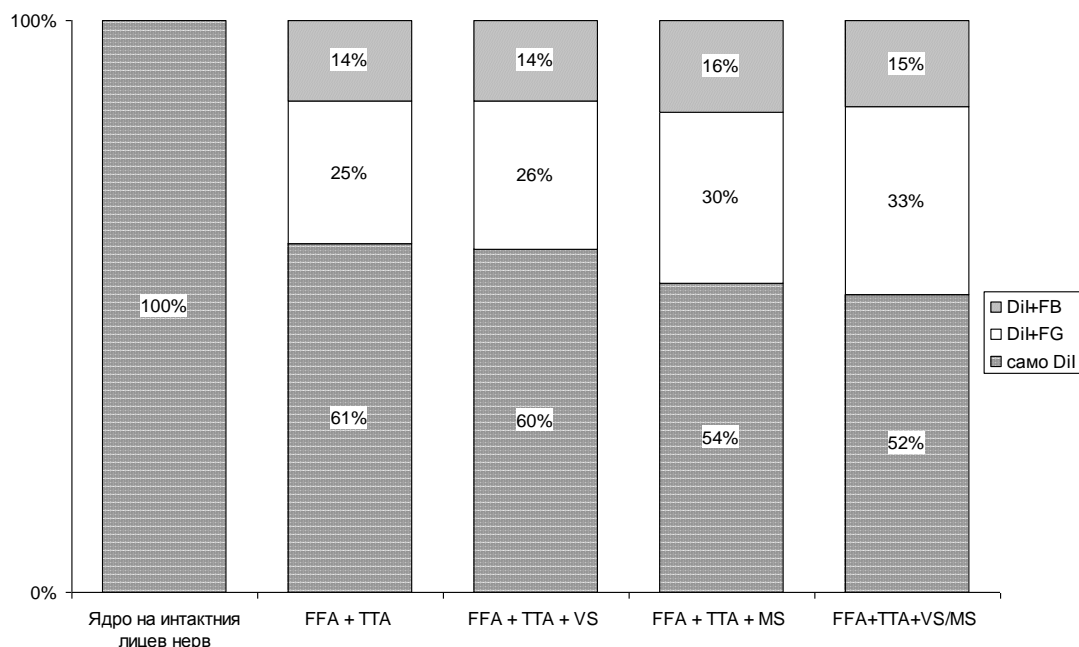
Степента на колатерално аксонално разклоняване остава висока независимо от стимулацията след комбинирано увреждане и възстановяване на лицевия и подочничния нерви.

При здрави животни ретроградно маркираните мотоневрони в ядрото на лицевия нерв показват ясно изразена миотопична организация. Четири месеца след дFFA+ТТА картината е напълно различна, като маркираните

мотоневрони са разпръснати из цялото ядро, а значителен брой от тях са и двойно маркирани. Сходна картина се наблюдава и при стимулираните плъхове независимо от характера на стимулацията.

Количествените измервания също не показаха значителни различия между групите животни. При нестимулираните плъхове (дFFA+ТТА) всички мотоневрони, проектиращи в *r. zygomaticus* (маркирани с DiI) наброяваха 231 ± 36 , а при стимулираните съответно – дFFA+ТТА+дVS – 385 ± 218 , дFFA+ТТА+дMS – 405 ± 192 и при дFFA+ТТА+дVS/дMS – 364 ± 253 . Изброяването на всички двойно маркирани неврони от ядрото на лицевия нерв, проектиращи в *r. zygomaticus* разкри сходен индекс на аксонално разклоняване при четирите експериментални групи: при дFFA+ТТА **40.69%** от оцветените с DiI мотоневрони са двойно маркирани, при дFFA+ТТА+дVS – делът им е **40,26%**, при дFFA+ТТА+дMS - **46.67%** и при дFFA+ТТА+дVS/дMS - **48.35%** (Фиг. 13).

Резултатите ясно показват, че и при комбинирана (двигателна и сетивна) нервна увреда колатералното аксонално разклоняване в мястото на лезията е високо и не се повлиява от начина на стимулация, независимо от подобрената функция. Единственото, което се наблюдава е слабо изразено снижение на индекса на колатерално аксонално разклоняване при животните подложени на комбинирана двигателна и сензорна увреда (дFFA+ТТА) в сравнение със животните подложени на изолирана увреда на лицевия нерв (дFFA).

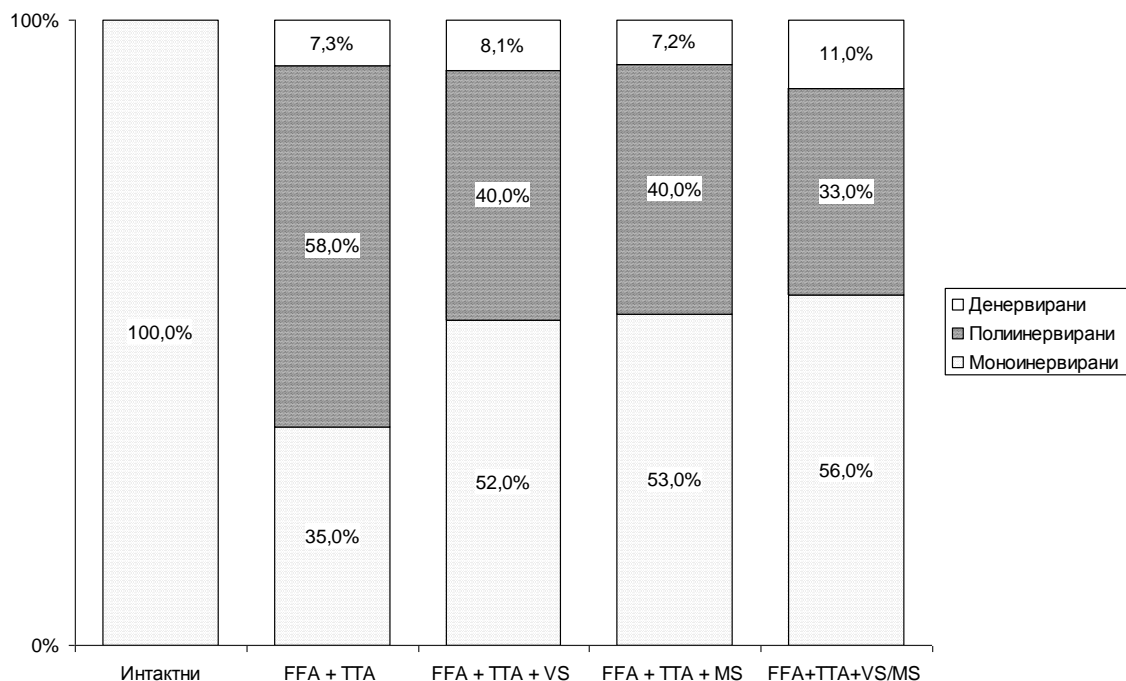


Фигура 13: Дял на мотоневроните проектиращи само в *r. zygomaticus* на *n. facialis* (маркирани с DiI; в червено), и едновременно в *r. zygomaticus* и *r. buccalis* (двойно маркирани с DiI и Fluorogold; DiI+FG; в жълто) и в *r. zygomaticus* и *r. marginalis mandibulae* (двойно маркирани с DiI и Fast Blue; DiI+FB; в синьо) четири месеца след едновременно хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв и на клончетата на подочничния нерв (дFFA+ТТА). Не се наблюдават съществени различия в колатералното аксонално разклоняване в мястото на увредата.

Мануалната стимулация и вибрисната сензорна стимулация подобряват качеството на реинервация след комбинирано увреждане и възстановяване на лицевия и подочничния нерв.

Качествената находка в *m. levator labii superioris* четири месеца след комбинирана нервна увреда (едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерв, дFFA+TTA) е сходна с картината, наблюдавана два месеца след изолирана увреда на лицевия нерв (дFFA) - видимо увеличен брой, преплитащи се и разклоняващи се аксонални клончета (хиперневротизация), нарушена реинервация с поява на аномални моторни плочки и видимо намален диаметър на мускулните влакна в сравнение с наблюдаваното при здрави животни.

Съществени разлики в броя на моторните плочки в *m. levator labii superioris* между различните групи животни не се наблюдаваха. При нестимулирани животни (дFFA+TTA) бяха преброени **1461 ± 241** моторни плочки, при животни подложени на сензорна стимулация (дFFA+TTA+дVS) – **1509 ± 235** моторни плочки, при плъховете подложени на мануална стимулация (дFFA+TTA+дMS) – **1719 ± 143**, при подложените на комбинирана стимулация (дFFA+TTA+дVS/дMS) – **1482 ± 332**, а при тези подложени на изолирана моторна увреда и продължителна дMS (дFFA+дMS за 4м) - **1461 ± 246**.



Фигура 14: Съотношение между моно-, поли- и денервирани моторни плочки в *m. levator labii superioris* четири месеца след едновременно хирургично прекъсване и зашиване на лицевия нерв и на клончетата на подочничния нерв (дFFA+TTA). Съотношението между поли- и моноинервирани моторни плочки при нестимулираните животни беше приблизително 1,7:1. При стимулираните животни (независимо от начина на стимулация) се наблюдаваше известно подобрение в модела на реинервация, като това съотношение се изместваше в полза на моноинервираните моторни плочки.

Четири месеца след комбинирана нервна увреда (дFFA+ТТА) едва около **35%** от моторните плочки в *m. levator labii superioris* са **моноинервирани**, **58%** показват белези на **полиинервация** и **7%** са **денервирани**. При животните третирани със сензорна вибрисна стимулация в продължение на четири месеца след комбинираната нервна увреда (дFFA+ТТА+дVS) количеството на **моноинервираните моторни плочки** нарастват до **52%**, **полиинервираните** намаляват до **40%**, а **денервираните** остават около **8%** от всички моторни плочки преброени в *m. levator labii superioris*. Промените след другите два протокола за стимулация са сходни: след четири месеца дMS (дFFA+ТТА+дMS) – **53% моноинервирани**, **40% полиинервирани** и **7% денервирани**, а след два месеца дVS, последвана от дMS за още два месеца (дFFA+ТТА+дVS/дMS) – **56% моноинервирани**, **33% полиинервирани** и **11% денервирани моторни плочки** (Фиг. 14). Подобрената функция след комбинирана сензорно-двигателна увреда и последваща стимулация отново е асоциирана с подобрен модел на реинервация в мускулите мишени, изразяващ се в намаляване на съотношението между полиинервирани и моноинервирани моторни плочки: **1,7:1** – при дFFA+ТТА, **0,8:1** – при дFFA+ТТА+дVS, **0,8:1** – при дFFA+ТТА+дMS и **0,6:1** – при дFFA+ТТА+дVS/дMS (Фиг. 14). При четирите експериментални групи от това проучване се забелязва трайно повишен дял на денервираните моторни плочки (между 7% и 11%) в сравнение с животните, подложени на изолирана увреда на лицевия нерв без последваща дMS.

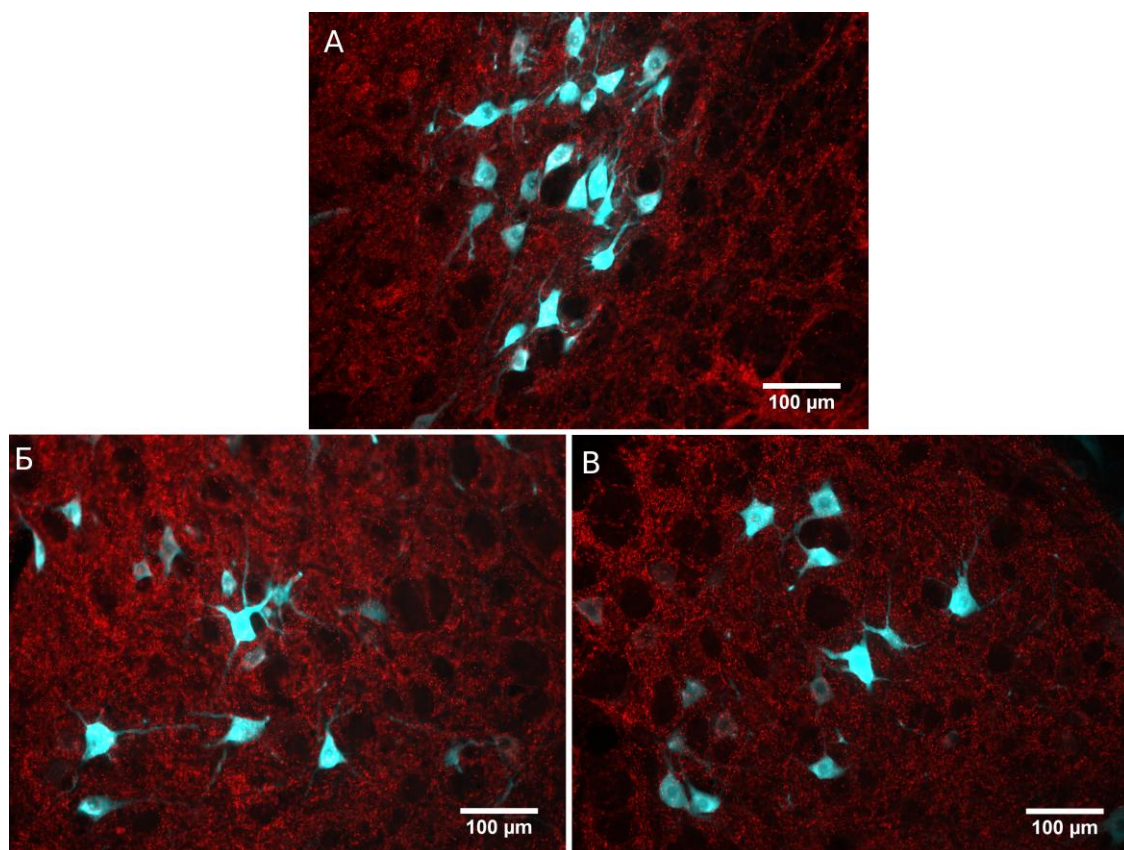
Синаптичният вход към мотоневроните, инервиращи мустачковата възглавничка остава понижен и не се повлиява от стимулацията след комбинирана увреда на лицевия и троичния нерв.

Промените в общата синаптофизинова активност в латералното подядро на лицевия нерв беше изследвано по начин подобен на вече описания. За анализа беше подбрана област в центъра на снимките с площ $247\,517\ \mu\text{m}^2$ ($0,25\ \text{mm}^2$), тъй като заснетото поле е с голяма площ и, особено в периферията на ядрото, обхваща и участъци принадлежащи към него. В латерално подразделение на ядрото на интактния лицев нерв бяха преброени средно **6603,68 ± 587,39** синаптични профила за срез, които съставляваха около **17,29% ± 2,01%** от изследвания обем (Фиг. 15 А, 16).

При всички експериментални групи се наблюдаваше статистически значимо ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni) намаление на тези показатели: при нестимулираните (дFFA+ТТА) животни бяха преброени средно **5962,61 ± 568,58** синаптични профила за срез през ядрото на оперирания лицев нерв, заемащи средно **11,84% ± 1,45%** от изследвания обем; при подложените на сензорна стимулация (дFFA+ТТА+дVS) – съответно **5993,75 ± 569,12** профила за срез, обхващащи **11,76% ± 1,38%** от изследвания обем; и при животните, третирани последователно със сензорна и мануална стимулация (дFFA+ТТА+дVS/дMS) – **5845,09 ± 688,41**

профила за срез, обхващащи $11,47\% \pm 1,77\%$ от изследвания обем (Фиг. 15 Б, В, 16).

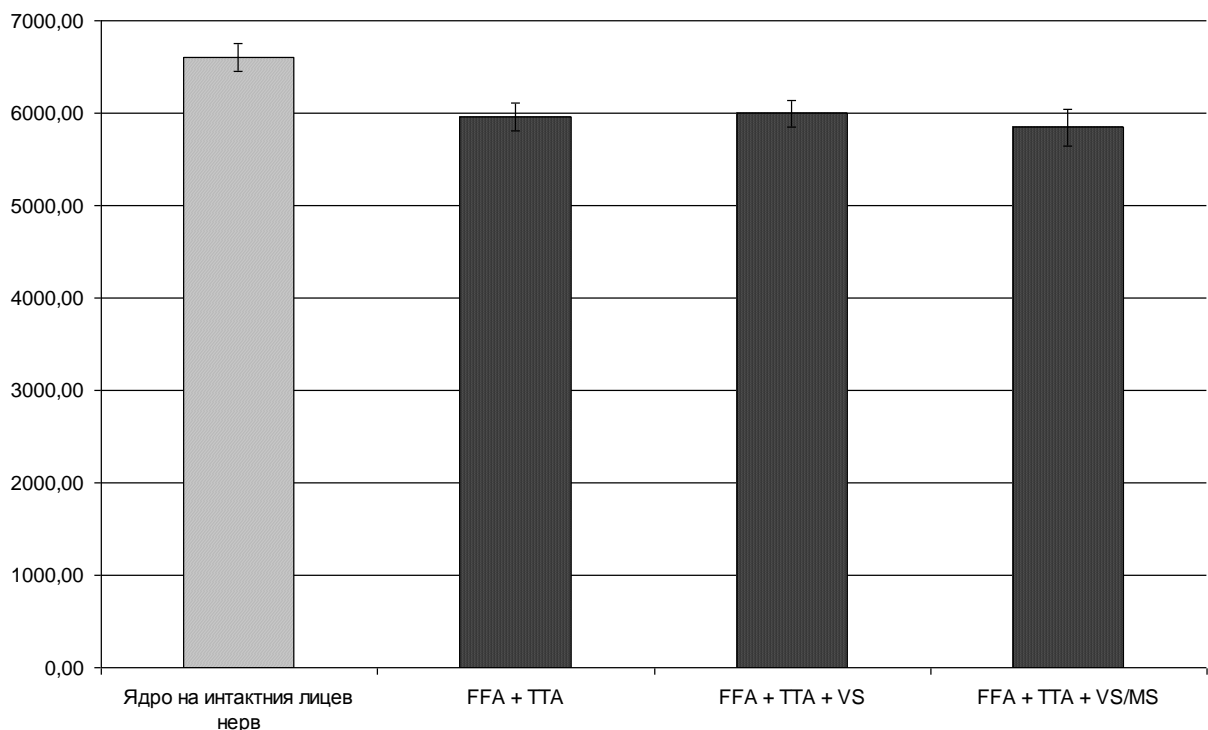
Количеството на перисоматичните синапси върху мотоневроните реинервирани мустачковата възглавничка се оценяваше като се преброяваха всички профили в непосредствената околност на маркираните с FB тела на мотоневрони (брой/мотоневрон) и биваха отнесени към съответните периметри (линейна синаптична плътност; брой профили/mm). В ядрото на интактния лицев нерв бяха изброени средно $22,41 \pm 8,54$ перисоматични синапса за мотоневрон с линейна гъстота от $162,23 \text{ mm}^{-1} \pm 37,19 \text{ mm}^{-1}$ (Фиг. 16).



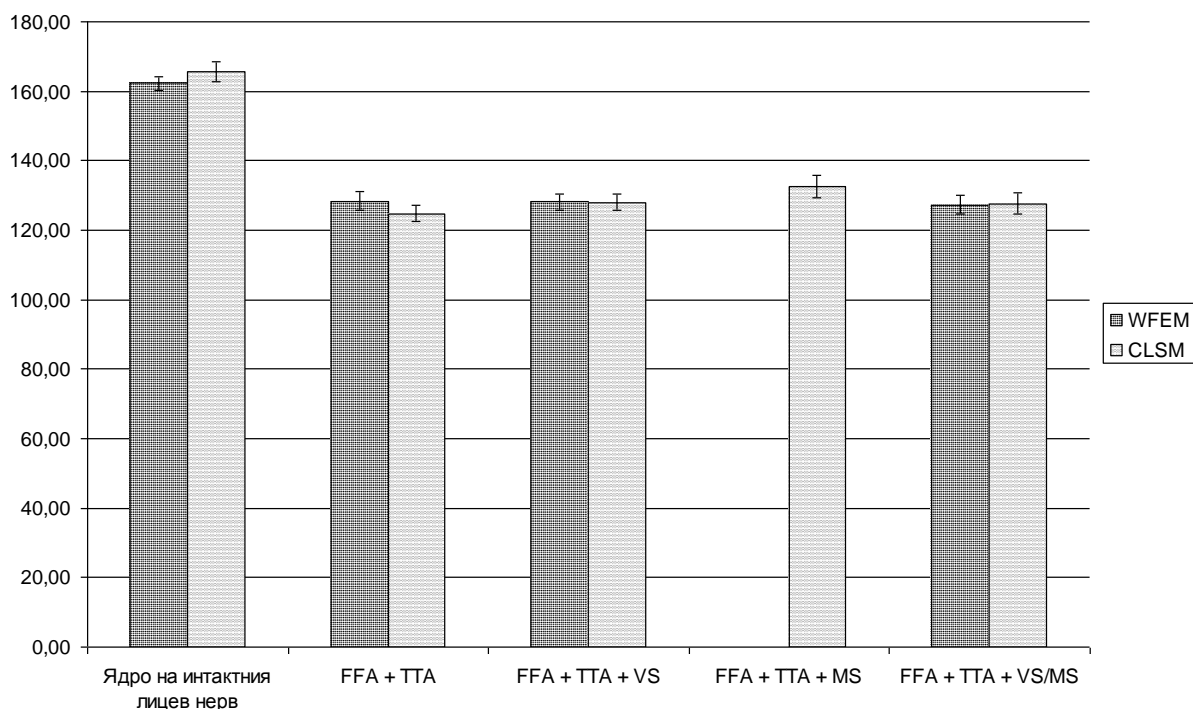
Фигура 15: Синаптофизинова активност в латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв. Пресинаптичните терминали се визуализират като множество ясно различни точки в невропила и около телата на невроните. А. Ядро на интактния лицев нерв. Б. Ядро на оперирания лицев нерв четири месеца след FFA+TTA без последваща стимулация. Телата на мотоневроните са пръснати из цялото ядро като израз на загубата на миотопична организация. В. Ядро на оперирания лицев нерв четири месеца след едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерв и последваща стимулация посредством форсирана свръхупотреба на увредените мустачки (FFA+TTA+VS). Находката е сходна с тази при нестимулираните животни и при животните подложени на другите стимулационни протоколи. Синтетични образи, получени от сливането на образите на ретроградно маркираните с FastBlue мотоневрони и оцветените със антисинаптофизин снимки от ядрото на лицевия нерв.

Четири месеца след комбинираната увреда на лицевия и троичния нерв (дFFA+ТТА) броя на перисоматичните синапси е намален - $16,48 \pm 7,05$, и не се повлиява нито от сензорната (дFFA+ТТА+дVS) - $16,15 \pm 6,75$, нито от последователната сензорна и мануална стимулации (дFFA+ТТА+дVS/дMS) - $16,39 \pm 7,1$ ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni). Намаленият брой синапси съответства на намалена линейна синаптична плътност (Фиг. 17): $128,38 \text{ mm}^{-1} \pm 40,87 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+ТТА); $128,11 \text{ mm}^{-1} \pm 41,47 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+ТТА+дVS); $127,22 \text{ mm}^{-1} \pm 39,12 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+ТТА+дVS/дMS).

Ръчното преброяване на перисоматичните синаптофизин-положителни частици с помощта на конфокален лазерен сканиращ микроскоп (CLSM) проведено от друг експериментатор произведе почти идентични резултати. В ядрото на интактния лицев нерв бяха изброени средно $34,08 \pm 8,54$ перисоматични синапса за мотоневрон с линейна гъстота от $165,46 \text{ mm}^{-1} \pm 16,28 \text{ mm}^{-1}$ (Фиг. 17, 18 А и В).



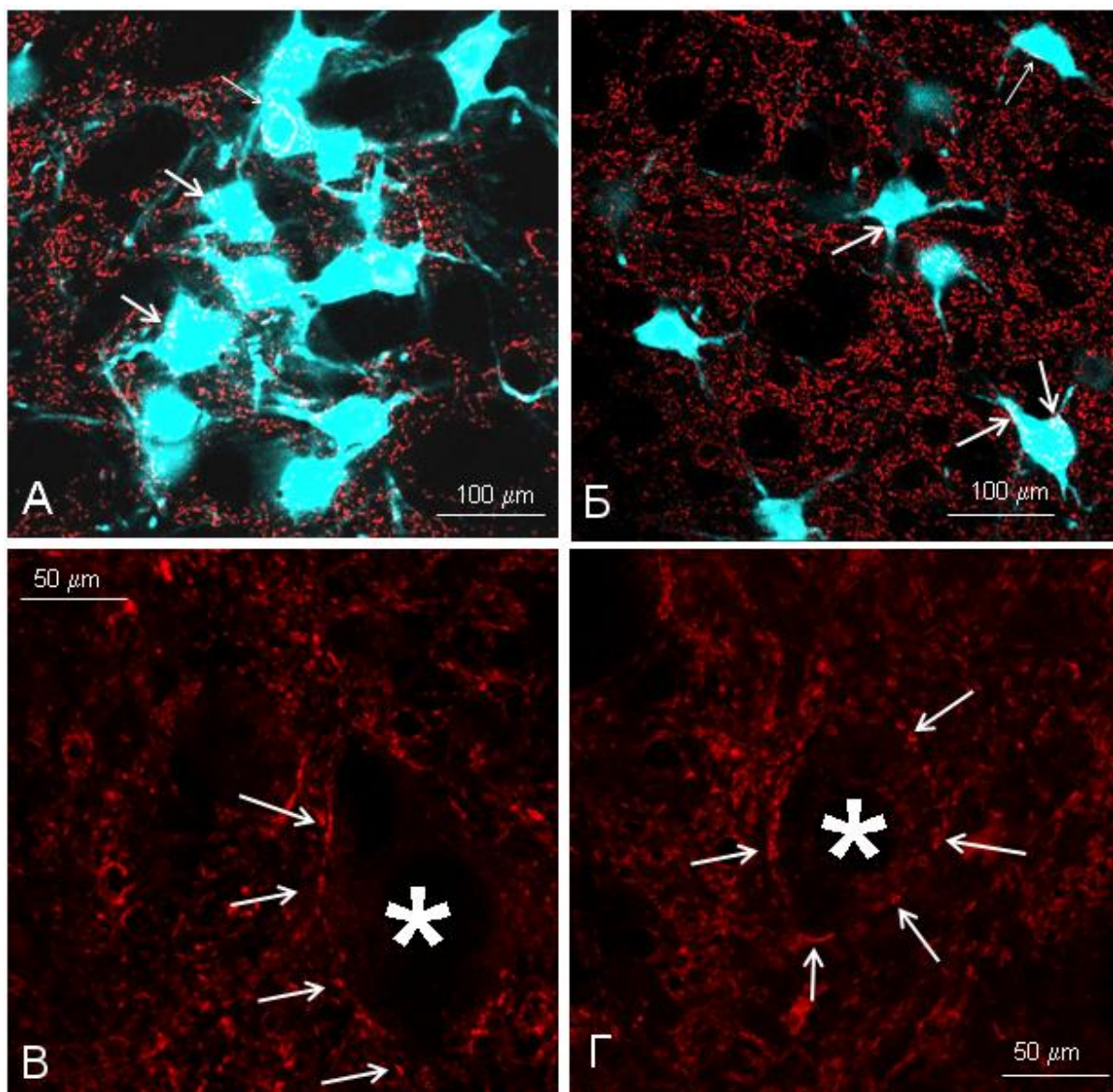
Фигура 16: Среден брой синаптични профили на поле ($247\ 517 \mu\text{m}^2$) от латералното подразделение на ядрото на лицевия нерв при плъхове, четири месеца след едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерв без последваща стимулация (FFA+ТТА) и след стимулация. Лентите за грешка отразяват интервала на доверителност на средната ($p \leq 0,05$).



Фигура 17. Средна линейна гъстота на перисоматичните синапси по периметъра на лицевите мотоневрони при плъхове, четири месеца след едновременна увреда и зашиване на лицевия и подоничния нерв. Сравнение между данните, получени посредством широкоапертурен епифлуоресцентен микроскоп (Widefield Epifluorescent Microscopy, WFEM) и лазерен сканиращ конфокален микроскоп (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Животните от група FFA+TTA+MS са изследвани само посредством CLSM. При останалите групи е налице пълно съвпадение между резултатите, получени по двата метода. Лентите за грешка отразяват интервала на доверителност на средната ($p \leq 0,05$).

Четири месеца след комбинираната увреда на лицевия и троичния нерв (дFFA+TTA) броя на перисоматичните синапси в ядрото от страната на оперативната интервенция е намален – $21,19 \pm 6,03$, и не се повлиява нито от сензорната (дFFA+TTA+дVS) – $22,11 \pm 5,52$, нито от мануалната (дFFA+TTA+дMS) – $25,12 \pm 4,02$, нито от последователната сензорна и мануална стимулации (дFFA+TTA+дVS/дMS) – $23,49 \pm 5,10$ ($p < 0,001$, ANOVA с *post hoc* тест на Bonferroni; Фиг. 17, 18 Б и Г).

Намаленият брой синапси съответства на намалена линейна синаптична плътност $124,8 \text{ mm}^{-1} \pm 13,2 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+TTA); $128,08 \text{ mm}^{-1} \pm 12,92 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+TTA+дVS); $132,6 \text{ mm}^{-1} \pm 16,96 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+TTA+дMS); $127,64 \text{ mm}^{-1} \pm 16,16 \text{ mm}^{-1}$ (при дFFA+TTA+дVS/дMS). (Фиг. 17)

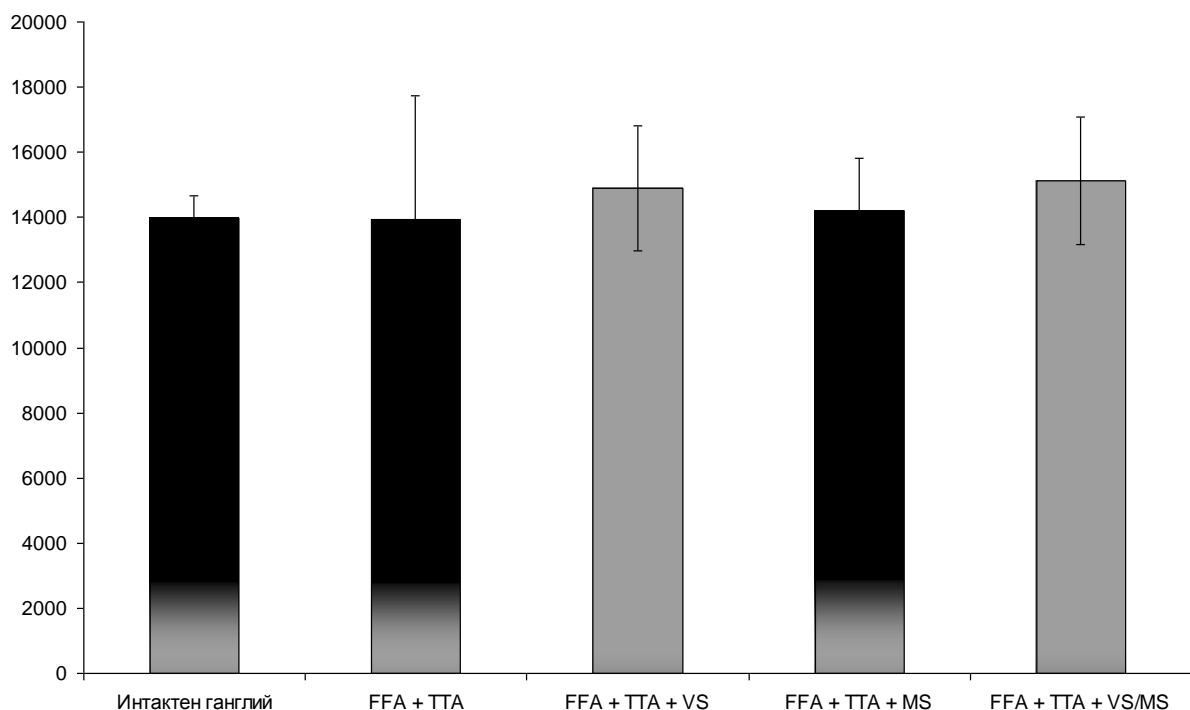


Фигура 18: Синаптофизинова активност, регистрирана посредством лазерен сканиращ конфокален микроскоп. Пресинаптичните терминали (стрелки) се визуализират при слабото увеличение на микроскопа като множество ясно различни точки в неврита и около телата на невроните, маркирани ретроградно с FastBlue, при слабо увеличение в ядрото на интактния лицев нерв (А) и в ядрото от страната на оперативната интервенция четири месеца след едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерви (Б) – оптични срези с дебелина 1 μm. Образите получени при по-голямо увеличение бяха използвани за ръчното изброяване на перисоматичните синапси (стрелки), разположени около телата на мотоневроните (звездички) в ядрото на интактния (В) и оперирания лицев нерв (Г).

Няма загуба на псевдоуниполярни неврони в троичния ганглий след прекъсването и зашиването на подочничния нерв.

Инжектираният в мустачковата възглавничка FB маркира псевдоуниполярните неврони в троичния ганглий, изпращащи периферни израстъци до мустачковата възглавничка и вибрисите. Преброяването на всички маркирани неврони в троичния ганглий не показва никакви различия между различните групи животни.

В ганглия на интактния троичен нерв (от страната противоположна на оперативните интервенции) средно 13980 ± 1709 псевдоуниполярни неврони в троичния ганглий инервират областта на вибрисите (Фиг. 19). В троичния ганглий на оперираната страна този брой остава приблизително същия четири месеца след дFFA+TTA – 13924 ± 4785 и не се променя съществено при различните протоколи за стимулация – при група дFFA+TTA+дVS са налице 14910 ± 2403 маркирани клетки в троичния ганглий, при дFFA+TTA+дMS – 14211 ± 2016 , а при дFFA+TTA+дVS/дMS – 15138 ± 2442 (Фиг. 19).



Фигура 19: Брой ретроградно маркирани тела на псевдоуниполярни неврони в ганглия на троичния нерв четири месеца след едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерв. Въпреки, че вариацията нараства, не се наблюдава статистически значима разлика в броя псевдоуниполярни неврони инервиращи мустачковата възглавничка. Лентите за грешка отразяват интервала на доверителност на средната ($p \leq 0,05$).

Дискусия

Мануалната стимулация подпомага възстановяването на вибрисната функция след прекъсване и хирургична реконструкция на лицевия нерв.

Възстановяването на ритмичните вибрисни движения при гризачите е полезен модел за изучаване на функционалното възстановяване след увреда на лицевия нерв при хора (Moran and Graeber, 2004; Brecht et al., 2006). За да избегнем грешни изводи искаме да подчертаем, че паралел с човешкото лицево окосмяване липсва, тъй като при човека лицевото окосмяване, миглите, веждите и вибрисите в предверието на носната кухина и външния слухов проход са лишени от *nn. arectores pilorum* (Bannister, 1995). Още повече, че *nn. arectores pilorum* по останалите части на тялото се инервират от норадренергични симпатикови аксонни терминали, а не от периферни моторни аксони. В този труд ние не само показваме, че мануална стимулация след увреда на лицевия нерв възстановява двигателната функция на мустачките при плъх, но също и предоставяме доказателства обясняващи подлежащите механизми.

Тук представяме първите доказателства от контролиран експеримент за ефикасността на мануалната мускулна стимулация за функционалното възстановяване след увреда на лицевия нерв при плъх. Чрез поглаждане на мустачките ние стимулирахме фините мускулни примки, инервирани от *n. facialis*, и постигнахме значителна редукция на дела на полиинервираните моторни плочки и пълно възстановяване на вибрисната двигателна активност. Протоколите за стимулация на различните групи бяха внимателно разработени, така че да могат да се открият смислени контролни групи (**Таблица 1**). При детайлния анализ на резултатите от функционалното изследване най-важните показатели, на които трябва да се обърне внимание са ъгловата амплитуда на вибрисните движения (разликата между максимална протракция и ретракция) и ъгловата скорост по време на активна протракция, тъй като те директно отразяват функционалната активност на моторните единици.

Успехът на лечението се определя от типа стимулация.

Важно и клинично значимо наблюдение в това проучване е, че успехът на лечението се определя от типа стимулация (**Фиг. 1**). Възстановяването в условия на обогатена жизнена среда, стимулираща употребата на лицевата мускулатура, контролираща вибрисните движения, бе напълно неефективно. Това е изненадващо, имайки предвид стимулиращите ефекти на обогатената среда върху нервната пластичност и адаптивния отговор (van Praag et al., 2000). Още повече, че се приема, че клиничният успех разчита на пластичността на кортикални и субкортикални невронални мрежи (Sanes and Donoghue, 2000). Нашите резултати не противоречат

непременно на тази гледна точка. В нашата експериментална парадигма, сетивната инервация на лицето остава интактна и не би трябвало да има каквато и да е промяна в соматосетивното корово представителство. От тук коровата пластичност вероятно е решаваща за възстановяването на сетивна, но не и на двигателна функция (Bisler et al., 2002). Изненадващо добрият резултат от мануалната стимулация показва важноста на приложението на функционално съвместими протоколи за стимулация (Beazley et al., 2003; Dunlop and Steeves, 2003).

Важна особеност на използваната от нас методика за функционална оценка е извършването на измерванията върху вибрисните движения по време на свободно изследване на околността от страна на плъха, с което се избягва ограничаването на движенията на животното. Вибрисните движения се синхронизират и десинхронизират с редица други двигателни феномени – душене и движение на главата (Welker, 1964), дишане (Welzl and Bures, 1977), и дъвкателни движения (Travers et al., 1997). Предишни резултати показват, че по време на свободно изследване плъховете ритмично движат главата си, така че да осъществят контакт с изследваната повърхност чрез микровибрисите си. Това периодично активно „микровибрисно позициониране“ се синхронизира с макровибрисните движения не само по време на свободно изследване, но и на задачи за разграничаване на повърхности (Towal and Hartmann, 2008). В резултат естественото движение на главата води до известна вариабилност в параметрите на вибрисните движения, както това е видимо на заснетите от нас 3-5 минутни видео последователности.

Ако главата е имобилизирана, фино настроената координация на микро- и макровибрисните движения е нарушена. В опит да компенсират последвалото отслабване на сензорните стимули, плъховете реагират със значително по-големи (и от тази гледна точка – нефизиологични) вибрисни движения с амплитуда от порядъка на 90° (Bermejo et al., 1996; Bermejo R. and Zeigler H. Philip, 2000; Hadlock et al., 2007), т.е. около 2 пъти по-голяма от регистрираната от нас при интактни плъхове.

Липсата на видим функционален резултат от стимулацията чрез обогатена жизнена среда (дFFA+EE) може да се обясни със сходни компенсаторни механизми: намалената сензорна стимулация в резултат на намалената подвижност на макровибрисите (следствие от повредата на лицевия нерв) се компенсира чрез активните движения на главата. Явно този механизъм е достатъчен за осъществяването на вибрисната сетивна функция и се стабилизира в хода на възстановителния период след нервната травма. Поради това стимулацията чрез обогатената околна среда не води до съществена промяна в моделите на активация на моторните единици. Към това се добавя и факта, че тази стимулация е относително симетрична, т.е. въздейства еднозначно върху мустачките от здравата и

оперираната страна, което допълнително допринася за непроменения модел на активация на мотоневроните в ядрото на лицевия нерв.

**Анатомичният еквивалент на възстановената
вибрисна двигателна функция е подобреният модел на
реинервация.**

Факторите, ограничаващи функционалното възстановяване, са слабо проучени. Нашият модел предоставя уникални възможности за изучаване на различните субстрати на нарушената функция по време на възстановяването. Беше проучено влиянието на различните протоколи за механична стимулация върху два феномена.

Възстановяването на вибрисна двигателна функция не зависи от интензитета на колатералното аксонално разклоняване.

Наблюдаваното от нас нарушение в миотопичната организация на ядрото на лицевия нерв (**Фиг. 2, 3, 13, 15; и 11**) се дължи на множеството (до 25) колатерални разклонения, които израстват от всеки прерязан аксон (Shawe, 1955). Тези персистиращи разклонения се присъединяват към различни клонове на лицевия нерв и пренасят ретроградно флуоресцентните маркери към случайни мотоневрони в лицевото ядро. Клончета на аксони, проектиращи едновременно в различни клонове на лицевия нерв, поемат и пренасят ретроградно едновременно два или три флуоресцентни маркера. Това от своя страна води до двойното и тройно маркиране на родителските неврони. В крайна сметка, в резултат на това силно изразено колатерално разклоняване в мястото на лезията, всеки от клоновете на лицевия нерв съдържа аксони от повече неврони отколкото при интактните животни (**Фиг. 3, 15; и 11**), което в периферията води до хиперинервация на таргетните мускули (Rich and Lichtman, 1989; Angelov et al., 1996; Streppel et al., 1998).

В съгласие със скорошни наблюдения (Guntinas-Lichius, Irintchev, et al., 2005), резултатите на настоящото проучване още веднъж поставят под въпрос функционалната значимост на колатералното аксонално разклоняване. При всички плъхове, както подложените на мануална стимулация, така и тези преминали само хирургично прерязване и зашиване на лицевия нерв без последваща стимулация, ретроградното маркиране демонстрира извънредно обилно колатерално аксонално разклоняване (**Фиг. 3, 15; и 11**). Както е видно от видео анализа на движенията, обаче, възстановяването на вибрисните движения (**Фиг 1**) е пълноценно при стимулираните животни и много слабо до никакво при плъховете неподложени на стимулация.

Недостатъчното възстановяване на ритмичните движения на мустачките след увреда на лицевия нерв, въпреки редуцията на колатералното разклоняване е наблюдавано от Guntinas-Lichius и сътр.(2005) и Tomov и сътр.(2002). Употребата на проводници за реконструкция на *n. ischiadicus* и

подобряване на точността на реинервацията има подобни резултати, но не води до подобряване на локомоторния дефицит при плъхове (Valero-Cabre and Navarro, 2002). Единственият извод от съществуващите и нашите експериментални доказателства е, че редуцираното аксонално разклоняване не води до по-добро функционално възстановяване. Обяснението на тази неочаквана находка засега е невъзможно. Можем само да предпологаме, че в резултат на зависимата от нуждите пластичност в ЦНС, ангажирането на аберантно инервиращите неврони е намалено или модифицирано чрез гръбначно-мозъчни рефлексни механизми и надспинални контролни вериги, така че функционалните нарушения от абнормната реинервация се свеждат до минимум. Някои проучвания при хора подкрепят тази възможност. Клетките от двигателните ядра могат да бъдат “преобучени” да изпълняват нова функция след мускулен сухожилен трансфер (Shert et al., 1986; Wiedemann et al., 1997). Ангажирането на отделните моторни единици може да се модифицира и чрез низходящи контролни механизми, както е показано при изследвания с електромиография с обратна връзка (feed back EMG) (Guntinas-Lichius, 2004).

Абнормната мускулна реинервация е от решаващо значение за възстановяването на двигателна функция.

На следващ етап оценихме обхвата на абнормната мускулна реинервация. Подобни данни от вътрешните фоликуларни мускули биха били много убедителни. Подобно изследване досега не е правено и за съжаление ние срещнахме сериозни непреодолими пречки. Затова ние изследвахме абнормната мускулна реинервация в *m. levator labii superioris*, външен вибрисен мускул, който подобно на вътрешните е инервиран от “шестте надлъжни клончета” на букалния клон на лицевия нерв.

При всички групи плъхове, които показаха лошо функционално възстановяване (Фиг. 1), наблюдавахме качествено сходна картина в реинервирания мускул: ненормално плътна мрежа от интрамускулни аксонални разклонения и полиинервация на приблизително 50% от моторните плочки, състояние определяно като “хиперневротизация” на мускулите (Фиг. 4, 5). Затова направихме предположение, че хиперневротизацията на мускулите и полиинервацията на техните моторни плочки са причината за лошото функционално възстановяване. Тази хипотеза се потвърждава от изследвания на реинервираните мускули при слепи плъхове от линията Royal College of Surgeons, порода Sprague Dawley (RCS/SD) и плъхове SD с нормално зрение, които след прекъсване и зашиване на лицевия нерв показват съответно много добро и слабо функционално възстановяване (Tomov et al., 2002). Докато при лошо възстановяващите се зрящи SD плъхове съотношението моно- към полиинервирани моторни плочки е 46% към 51%, то при слепите RCS/SD

плъхове с добро функционално възстановяването то е 88% към 10% в полза на моноинервираните.

Значителната редукция на дела на полиинервираните мускулни влакна, наблюдавана от нас (Фиг. 5, 14) може поне отчасти да обясни функционалното подобрене. Феноменът на полиинервацията винаги се е смятал за фактор ограничаващ възстановяването на функцията (Schröder, 1968; Gorio et al., 1983; Grimby et al., 1989; Trojan et al., 1991; Barry and Ribchester, 1995; Tam and Gordon, 2003). При изучаването на *m. levator labii superioris* наблюдавахме “хиперневротизация” на мускулите при всички плъхове неподложени на мануална стимулация (Фиг. 5, 14; и 12). За разлика от тях дялът на полиинервираните плочки е значително по-малък при животни подложени на прекъсване и зашиване на лицевия нерв последвано от мануална стимулация или от комбинирана с обогатена среда мануална стимулация.

Мануалната стимулация препятства деаферентацията на регенериралите лицеви мотоневрони.

В търсене на обяснение за благоприятния ефект на dMS насочихме вниманието си към промените настъпващи в ядрото на лицевия нерв в ствола. С помощта на имунохистохимично оцветяване за синаптофизин показахме, че краткотрайна, но постоянна мануална стимулация на вибрисните мускули след прекъсване и зашиване на лицевия нерв, предотвратява предизвиканата от нараняването загуба на аферентния синаптичен вход към лицевите мотоневрони (Фиг. 7).

5.3.1. Възстановяването на синаптичния дефицит е непълноценно два месеца след прекъсване и зашиване на лицевия нерв.

След нараняване на лицевия нерв, синаптичните терминали бързо се отделят от мотоневроните, феномен известен като “синаптично оголване” - synaptic stripping (Blinzinger and Kreutzberg, 1968; Graeber and Kreutzberg, 1988). Тази посттравматична деаферентация е обратима, ако настъпи реинервация (Neiss et al., 1992; Guntinas-Lichius et al., 1994; Mader et al., 2004). Количествен електронно-микроскопски анализ на регенерирани мотоневрони инервиращи *m. gastrocnemius* при котка, обаче разкрива, че възстановяването на синаптичния вход е непълноценно по-отношение на няколко аспекта (Brännström and Kellerth, 1999).

Тук ние предоставяме първите количествени доказателства за дефицита на регенериралите мотоневрони при парадигмата на лицевия нерв. Това твърдение е основателно, като се има предвид следното: (i) Имунохистохимичното оцветяване за синаптофизин комбинирано със денситометрия въз основа стойността на сивия цвят е утвърден подход за приблизителна преценка на пресинаптичните терминални уплътнения в определен участък от ЦНС (Masliah et al., 1990; Svensson and Aldskogius, 1993; Calhoun et al., 1996; Spiwox-Becker et al., 2001; Tiraihi and Rezaie, 2004). При начина по който го прилагаме, методът предоставя числа

пропорционални на броя имунопозитивни структури, а не интензитет на имунофлуоресценцията; (ii) Ядрото на лицевия нерв практически не съдържа γ -мотоневрони и интерневрони (Sherwood, 2005), така че всички синаптични терминали в това ядро участват в синапси върху дендритите и телата на α -мотоневроните, с изключение на вероятен малък брой аксо-аксонални синапси; (iii) Измерванията бяха извършени върху латералното подядро на ядрото на лицевия нерв, което съдържа мотоневрони, които проектират само към г. buccalis n. facialis и са аксотомирани при процедурата. След като практически всички неврони оцеляват след аксотомията и реинервират периферните мускули (Moran and Graeber, 2004; Raivich and Makwana, 2007), нарушенията в синаптичния вход не могат да се асоциират с преживяемостта на клетките или с успеха на регенерацията.

Мануалната стимулация възстановява синаптичния вход към лицевите мотоневрони.

На този фон гранулометричното филтриране и последващото броене позволяват получаването на разбираеми количествени оценки за промените в синаптичния вход, както в цялото ядро така и в перисоматичните участъци. Резултатите показват, че както средният брой синапси на напречен срез през ядрото на лицевия нерв, така и обемната фракция на синаптофизина са намалели с 10%-13% два месеца след дFFA (Фиг 7). По отношение броя на синапсите в перисоматична позиция (по-голямата част от които са аксосоматични и проксимални аксодендритни синапси) е налице намаление от същия порядък, но при перисоматичната линейна синаптична плътност намалението е по-значително – с около 17% (Фиг 7). Това вероятно се дължи на нарастването на периметъра на мотоневроните в ядрото на оперирания (дFFAсамо и дFFA+дMS; средно 114 μm) в сравнение с ядрото на интактния лицев нерв (средно 106 μm). Използваният от нас метод не позволява точно да се оценят промените в синаптичния вход в различните компартменти на мотоневрона (тяло и различни сегменти от дендритното дърво). Въпреки това от наблюдаваните промени в общия и перисоматичен брой синапси можем да заключим, че редукцията в синаптичния вход в аксосоматичния и аксодендритния компартмент е равностойна. При всички случаи приложението на дMS в продължение на два месеца след операцията противодейства на наблюдаваната синаптична загуба.

Като всеки метод за преценка на синаптичния вход, и използваният от нас си има недостатъци. При него е невъзможно да се различат измененията в различните трансмитерни системи (възбудни, инхибиторни и модулаторни), повлияващи функциите на мотоневрона по различен начин. Имайки предвид това е важно да се отбележи, че е възможно и вероятно инхибиторните и възбудните синапси да бъдат повлияни по различен начин.

Възстановяването на синаптичния вход има второстепенно значение за възстановяването на двигателна функция.

Нашите наблюдения върху синаптичната плътност внушават, че механичната стимулация предотвратява свързаната с увредата и възстановяването на лицевия нерв загуба на аференти към ядрото на лицевия нерв. След като както подобряването на функцията, така и плътността на аксонните терминали, са по-добри при третираните отколкото при нестимулирани плъхове, то изглежда, че синаптичният вход е другият структурен параметър, освен степента на полиневронална реинервация на мускулните влакна, който съответства на степента на възстановяването на функцията след дFFA. Да се дефинира подобна структурно-функционална връзка е привлекателно, но са необходими допълнителни проучвания, както бе споменато горе, за да се потвърди и обясни подобна взаимовръзка. Остава и въпросът за величината на наблюдавания ефект: Наблюдаваните разлики между отделните групи макар и статистически значими, т.е. стабилни, са много малки по абсолютна стойност. При такива малки разлики значението на синаптичния вход за възстановяването на адекватна вибрисна функция вероятно е само спомагателно. Независимо от това намалената загуба на синаптични терминали след дMS е категоричен знак за наличието на централен механизъм при осъществяване на благоприятния ѝ ефект.

Астроглиозата е белег на изразена пластичност в ядрото на лицевия нерв.

Астроцитната реакция е един от първите индикатори на синаптичната загуба, настъпваща след аксотомия. Както показахме обаче количеството GFAP в засегнатото от аксотомията ядро на лицевия нерв е трайно повишено дори и два месеца след операцията независимо от стимулацията и функционалното подобрене (Фиг. 8, 9). Тъй като не можахме да установим връзка между промените в синаптичния вход към ядрото на лицевия нерв и количеството GFAP, смятаме че късната астроцитна реакция е белег на интензивните пластични промени настъпващи в засегнатото ядро на лицевия нерв. Това твърдение е подкрепено и от наблюденията по висок интензитет на реакцията при стимулирани в сравнение с нестимулирани животни, но се нуждае от допълнително изследване и уточняване.

Подпомогнатото чрез мануална стимулация възстановяване на двигателна активност след увреда на лицевия нерв изисква интактни сетивни пътища.

При възстановяването след увреждане на лицевия нерв се наблюдава йерархия в зависимост от състоянието на сетивната обратна връзка през троичния нерв и дали е приложена мануална стимулация. Най-качествено възстановяване се наблюдава при прилагането на дMS при интактна

сетивна система. Ако обратната връзка през троичният нерв е повредена обаче, резултатите са значително по-лоши (дори по-лоши отколкото ако не прилагаме стимулация). Взети заедно тези находки внушават, че стратегиите за рехабилитация трябва много добре да се съобразят с тежестта както на моторния, така и на сензорния дефицит.

Една от нашите главни находки е, че качеството на моторната реинервация на мустачковите възглавнички и възстановяването на функцията на мустачките бе влошено след увреждане на сетивния вход (**Фиг. 10**). Едно от възможните обяснения е, че трайното премахване на сетивната обратна връзка от мустачковите възглавнички лишава мотоневроните от трофична поддръжка и така тежко ограничава възстановяването им. Действително, в гръбначния мозък пълното прекъсване води до едновременна загуба на моторна и двигателна функция. Мотоневроните разположени дистално от нараняването частично загубват аферентите си, атрофират и дендритното им дърво се свива, състояние което персистира поради липса на спонтанна регенерация (Spruston et al., 1995; Segev, 1998; Vetter et al., 2001). Деаферентация и атрофия се наблюдават и след аксотомия на периферни нерви, но за разлика от гръбначно-мозъчното нараняване, периферните промени са обратими след реинервацията на целите, особено ако липсва сензорна увреда (Blinzinger and Kreutzberg, 1968; Sumner and Watson, 1971; Sandler and Bernstein, 1982; Brännström, Havton, and Kellerth, 1992a, 1992b; Noven et al., 1993; Brännström and Kellerth, 1998, 1999).

Аблацията на подочничния нерв напълно лишава плъха от обратна връзка от областта на мустачките и по този начин напълно премахва ефектите на дMS, осъществявани по този път. Наблюдаваното влошаване на функцията и качеството на реинервация на мускулите мишени след приложението на дMS при тези условия ни принуди да преразгледаме схващанията си относно механизма на действие на дMS. (вж. долу)

***Адекватната неинвазивна стимулация подобрява
вибрисната двигателна функция и модела на
реинервация на мускулите мишени по време на
едновременната регенерация след увреда на лицевия и
троичния нерв.***

За да тестваме изводите си от предходните експерименти, ние подложихме нова група плъхове на комбинирана увреда и зашиване на лицевия и подочничния нерв (дFFA+ТТА). Основната разлика при тази нова манипулация беше, че чрез анастомоза край-в-край създадохме оптимални условия за регенерацията и на лицевия и на подочничния нерв. Стимулационният протокол също беше променен: освен само дMS, в единия вариант дMS беше заменена със сензорна вибрисна стимулация чрез премахване на контралатералните мустачки (дFFA+ТТА+дVS), а според другия животните бяха подложени през първите два месеца на

сензорна, а през следващите два на мануална стимулация (дFFA+ТТА+дVS/дMS). Доводите ни за тази промяна бяха следните: (1) Имайки предвид ефекта на подобна сензорна стимулация върху пластичността в първичната сетивна кора (Hoffman et al., 2003; Whitaker et al., 2006) предположихме, че подобна схема на стимулация би се отразила благоприятно върху възстановяването на системата на троичния нерв; (2) Чрез дVS се избягва локалното въздействие на дMS върху меките тъкани, което се оказва неблагоприятно в условията на сетивна денервация (вж. секции 4.2 и 5.4), а чрез последователната стимулация (дVS/дMS) то се отлага във времето до момент, когато регенериращият подочничен нерв вече е реинервирал мустачковата възглавничка.

И трите предложени протокола за стимулация (дFFA+ТТА+дMS, дFFA+ТТА+дVS и дFFA+ТТА+дVS/дMS) доведоха до ясно изразено подобрение във модела на реинервация на мустачковата мускулатура и съответно двигателната вибрисна функция в сравнение с нестимулираните плъхове (Фиг. 12, 14; , 12). Независимо от това, качеството на това подобрение е далеч от наблюдаваното при плъхове подложени на чиста моторна увреда. Обяснение за това трябва да се търси в увредената система на троичния нерв и неадекватната обратна връзка, която тя осигурява. Въпреки че, както показахме, броят на сетивните неврони в ганглия на троичния нерв, които инервират мустачките на плъха, се възстановява напълно независимо от приложението на стимулация, функционирането на троичния нерв е влошено. Това се дължи на тежките изменения, които настъпват след сензорна нервна увреда както дистално така и проксимално от сетивните ганглии. След аксотомия на периферните израстъци на псевдоуниполярните неврони се наблюдава пъпкуване и разклоняване и в областта на централните израстъци, които навлизат във функционално чужди територии от ЦНС (Navarro et al., 2007). Тези централни изменения заедно с наблюдаваните в периферията хиперневротизация, погрешно насочване и аберантна реинервация водят до нефизиологична реорганизация в рецепторните полета, соматичните подкорони и корони представителства и нарушение на директната или индиректна обратна връзка до мотоневроните (Navarro et al., 2007). Изглежда, че нито сензорната, нито последователното приложение на сензорна и мануална стимулация успяват да преодолеят и коригират тези нарушения в системата на троичния нерв. Това заключение се потвърждава и от наблюдаваната от нас редукция в синаптичния вход към ядрото на лицевия нерв и телата на мотоневроните реинервирани мускулатурата на мустачките – нито един от протоколите за стимулация не успява да възстанови синаптичния вход до нивата наблюдавани в ядрото на интактния лицев нерв (Фиг. 16, 17). От друга страна нарушенията в системата на троичния нерв не позволяват да се осъществи напълно благоприятното въздействие на дMS, дVS и дVS/дMS. Независимо от това

наличието на частично подобрене показва, че при разработването на адекватен протокол за стимулация би могло да се осигури възстановяване на функцията дори и при смесена нервна увреда.

Механизми за осъществяване ефектите на асиметричната ипсилатерална стимулация (∂MS и ∂VS).

Разработването на адекватен и надежден протокол за неинвазивна стимулация след периферна нервна увреда и транслацията му за нуждите на терапията на постденрвационните аномалии в хуманната медицина изисква изясняване на механизма, по който предложената от нас форма на стимулация осъществява ефектите си.

Локални ефекти на мануалната стимулация.

Мануалната стимулация, извършвана по начина описан от Angelov и сътр. (2007), представлява комбинация от локален масаж на меките тъкани и интензивно (макар и краткотрайно) сетивно дразнене на мустачките на плъха с комплексно въздействие, в резултат на което се наблюдават редица феномени, локализирани в мястото на въздействието и в ЦНС. Предишни проучвания показват, че изкуствено наложената през фазата на синаптично формиране и консолидация мускулна активност редуцира интрамускулното аксонално разклоняване (Brown et al., 1980; Tam et al., 2001; Deschenes et al., 2006). Вътремускулното аксонално пъпкуване/разклоняване в отговор на мускулна парализа се появява в следствие на късообхватни разтворими стимули, произвеждани от неактивните мускулни влакна (Brown and Ironton, 1977; English, 2003; Kang et al., 2003; Tam and Gordon, 2003). Мускулите подложени на ∂MS вероятно произвеждат по-малко растежни фактори и така ограничават неадекватното вътремускулно аксонално разклоняване (Tam et al., 2001; Love et al., 2003). В съгласие с това два последващи доклада демонстрират, че директната мускулна, но не и нервна, стимулация подтиска интрамускулното пъпкуване на аксоните вероятно по модела на предизвиканата от междуаксонна конкурентна неутрализация и/или противодействие на стимулите за разклоняване произхождащи от денервираните мускулни влакна (Brown and Holland, 1979; Love et al., 2003). Друг възможен субстрат на промените в модела на реинервация на засегнатите мускули е терминалната Шванова клетка, която след аксотомия мигрира от периневриума, уголемява се и образува “мостчета”, достигащи близките моторни плочки. Такива мостчета на терминалните Шванови клетки привличат вътремускулни клончета от интактните аксони към денервираните моторни плочки (Son et al., 1996). Израстъците на терминалните Шванови клетки предшестват пъпкуването от интактните вътремускулни аксони и по-този начин могат да инициират вътремускулното аксонално разклоняване (Dickens et al., 2003). Мануалната стимулация може да ограничава разпространето на

израстъците на терминалните Шванови клетки и тяхната способност да примостяват моторните плочки. Както упражненията с бягане, така и електричната стимулация смущават образуването на мостове от терминалните Шванови клетки (Love et al., 2003; Tam and Gordon, 2003).

В допълнение dMS директно въздейства на денервирания мускул, като подобрява циркулацията, редуцира фиброзата и поддържа характеристиките на мембраните и способността им да реагират на акционни потенциали щом се осъществи реинервацията (вж. секция 1.6Schwartz et al., 1984). Клинични проучвания показват, че масажът на меките тъкани на лицето след увреждане на лицевия нерв подобрява кръвотока, лицевата симетрия и мимиката (Novind and Nielsen, 1974; Beurskens, 1990; Frach et al., 1992; Coulson, 2005).

Благоприятните ефекти на мануалната стимулация се осъществяват посредством сетивната обратна връзка.

Сетивният вход е друг вероятен, но непроучен, ключов фактор повлияващ възстановяването на движенията. В нашата парадигма на нервна увреда моторните аксони са увредени, но веригите доставящи сетивна информация от кожата на лицето до мотоневроните на лицевия нерв са интактни. Едната от възможностите е мануалната стимулация да подобрява сетивния вход и с това да повлиява положително нервните вериги. При пълно прекъсване на гръбначния мозък мотоневроните, разположени дистално от увреждането атрофират, дендритните им корони се свиват и биват частично деаферентирани (Spruston et al., 1995; Segev, 1998; Vetter et al., 2001). Подобно на този механизъм аксотомията предизвиква деаферентация на мотоневроните и промени в телата им и дендритните им корони (Blinzinger and Kreutzberg, 1968; Lux and Schubert, 1975).

Аферентни аксони могат също да изпълняват директни трофични въздействия върху телата и дендритите на мотоневроните, което води до подобрена продукция на асоциирани с пластичността молекули като асоциираният с растежа протеин 43 (growth associated protein 43, GAP-43), синапсин I (synapsin I), цикличен аденозинмонофосфат (cAMP) и произхождащият от мозъка трофичен фактор (BDNF), които стимулират дендритния растеж и синаптичното ремоделиране (Al-Majed et al., 2004; Pearse et al., 2004). Идеята, че стимулацията на интактните мрежи подобрява функцията на увредените кръгове е подкрепена от следващи проучвания при пациенти: стимулацията на парализираните лицеви мускули и електромиографски или нервномускулни програми за преобучение са много ефективни за подобряване на лицевия контрол и функцията дори и при случаи на дълговременна парализа (Barbara et al., 2003; Cronin and Steenerson, 2003; VanSwearingen and Brach, 2003).

Въпросът повдигнат от нашата работа с плъхове е: Защо мануалната стимулация на вибрисните мускули подобрява възстановяването на

функцията при интактна сензорна система, но го влошава при липсата на нормална сетивна обратна връзка?

При интактни сетивни пътища мануалната стимулация осигурява почти нормален сетивен вход към мотоневроните в ядрото на лицевия нерв, както и към сетивната и моторна кора, като по този начин поддържа подходящи нива на възбудимост в лицево-тргеминалната рефлексна дъга (Sosnik et al., 2001; Minnerly and Simons, 2003). Такава относителна стабилност по всяка вероятност директно повлиява благоприятно мотоневроните. Друг механизъм зад подобрените резултати от дMS е, че сетивният вход може да подпомогне регенерацията на мотоневрони като стимулира пластичността на ствола (или гръбначният мозък), феномен който също изглежда е ключов за възстановяването след периферна нервна увреда (Sulaiman et al., 2002; Guntinas-Lichius, Irintchev, et al., 2005; Galtrey et al., 2007).

дMS и дVS – разновидности на ипсилатерална асиметрична сензорна стимулация.

Резултатите от експерименталната ни работа, не ни позволяват категорично да свържем описаните локални и централни феномени със наблюдаваното подобрене на модела на реинервация и функцията на вибрисната мускулатура след дMS и дVS. От една страна, както вече споменахме, количествените промени в синаптичния вход не са достатъчно големи при изолирана увреда на лицевия нерв (дFFA), а при смесената увреда (дFFA+ТТА) дори липсват. От друга страна, при приложението на дVS локалното механично въздействие върху засегнатите мускули е сведено до минимум и въпреки това е налице подобрене в модела на реинервацията и функционирането им. Това беше потвърдено наскоро и от работата на Lindsay и сътр. (2010), които наблюдават сходни резултати при осъществяване на стимулацията с помощта на четчица, като по този начин минимализират мекотъканныя масаж. Ето защо, макар и да не можем да отхвърлим значението на гореизложените промени в ядрото на лицевия нерв и вибрисните мускули под влияние на стимулацията, ние не можем и да ги приемем като ключови за възстановяването на моторната функция след периферна нервна увреда. Освен това сходните резултати от приложението на различни стимулационни протоколи (мануална мускулна стимулация – дMS, пасивна сензорна вибрисна стимулация – дVS, и активна сензорна вибрисна стимулация по начина предложен от Lindsay и сътр., 2010) ни водят до заключението, че основен двигател на наблюдаваното подобрене е **асиметричната ипсилатерална сетивна стимулация на вибрисния апарат**, а механичното въздействие върху меките тъкани на мустачковата възглавничка има само допълващ ефект.

Подобреният модел на реинервация след асиметрична стимулация може да е резултат от десинхронизираната мотоневронна активност.

Благоприятното въздействие на асиметричната стимулация върху аберантната реинервация на таргетните мускули може да се обясни с потенцирането на конкурентната синаптична елиминация, започваща след реинервация. Съвременното схващане е, че нервномускулната активност, макар и незадължителна (Barry and Ribchester, 1995; Costanzo et al., 2000), има съществено значение за протичане на синаптичната елиминация. Начинът, по който dMS влияе на този процес вероятно е свързан с централни ефекти медиирани от интактната система на троичния нерв.

В свое проучване Buffeli и сътр. (2004) показват, че характеристиката на нервномускулната активност е от значение за оптималното протичане на синаптичната елиминация както по време на развитието, така и след реинервация при възрастни плъхове. Авторите показват, че синхронната активация на мотоневроните стабилизира хиперневротизацията на реинервираните мускули, докато асинхронната мотоневронна активност оптимизира конкурентната синаптична елиминация и намалява полиневроналната инервация на моторните плочки. От функционална гледна точка интензивното едностранно дразнене на вибрисите по време на dMS представлява за ЦНС на плъха сигнал (за вероятно налично от едната страна голямо препятствие), който превключва режима на движение на мустачките от симетрични махове към асиметрично и фовеално размахване (Semba and Egger, 1986; Gao et al., 2001; Berg and Kleinfeld, 2003). Докато при симетричните махове се касае за едновременното активиране на голям брой моторни единици, то при фовеалното е налице последователна асинхронна активация на отделни моторни единици. В този смисъл по време на dMS лицевата моторна система на плъха е подложена на продължителна десинхронизирана активация, което би имало благоприятно въздействие върху полиневроналната инервация на таргетните мускули. Този модел може да обясни и липсата на ефект от стимулацията чрез жизнената среда (EE), която стимулира с еднаква интензивност вибрисите и от интактната и от оперираната страна.

Както показахме, MS след комбинирана увреда на лицевия и подочничния нерв има много по-тежки последствия в сравнение със случаите, когато сетивната система остава интактна. Предвид екстремните нарушения в сензорната и мотоневронната възбудимост след увреда на сетивните аференти (Schwarz et al., 1983; Spielmann et al., 1983; Bove et al., 1985; Devor et al., 1989), както и извънредното аксонално разклоняване (Shaw and Bray, 1977; Diamond et al., 1987; Navarro et al., 2007) и загуба на GABA-ергичен инхибиторен контрол (Castro-Lopes et al., 1993), въобще не е изненадващо че възстановяването на функцията при животни с увреда на лицевия и подочничния нерв е толкова слабо. Ние смятаме, че dMS

“преговарва” система, която вече е податлива на свръхвъзбудимост, като вероятно води до ексцитотоксичност и необратима увреда. Освен това, тъй като CPG генерира ритмичните симетрични вибрисни движения по начин, независим от сетивния вход, процесите на конкурентната синаптична елиминация в таргетните мускули протичат при влошени условия (синхронна активация на моторните единици). Към това се добавя и предизвиканото от дMS локално подтискане на аксоналното интрамускулно разклоняване. По този начин наличната в таргетните мускули комбинация от значителна полиневронална инервация и повишено ниво на денервирани моторни плочки (вероятно и цели моторни единици) допълнително уврежда моторната функция при дMS след едновременната лицева и тригеминална увреда.

Разбира се допълнително увреждащо влияние могат да имат вероятното наличие на микроневроми със спонтанна активност в проксималния остатък от *n. infraorbitalis*, както и нарушенията в архитектурата на сетивните ядра на троичния нерв предизвикани от екстирпацията му.

Нарушенията в рецепторните полета и соматотопичната и функционална реорганизация на системата на троичния нерв при едновременната увреда и регенерация на лицевия и подочничния нерв (дFFA+ТТА), вероятно не позволяват на десинхронизацията да обхване достатъчна фракция от моторните единици, поради което моделът на реинервация и двигателната функция на вибрисната мускулатура не се възстановяват напълно, макар и да има известно подобрение.

Вероятно в основата на описания десинхронизиращ механизъм на ипсилатералната асиметрична сетивна стимулация стои взаимодействието между висшите подкорови и корови кръгове и стволския сензо-моторен кръг. Първите, от една страна, контролират активността на CPG и променят моделите на активация на лицевите мотоневрони. От друга страна интензивното асиметрично дразнене на макровибрисите преодолява инхибиращия ефект на CPG върху стволския тригемино-фациален кръг, което води до асинхронното разреждане на отделните мотоневрони по силата на положителната обратна връзка осигурявана от този нервен път. При едновременно прекъсване и зашиване на лицевия и подочничния нерв (дFFA+ТТА) нарушенията в системата на троичния нерв са най-силно изразени близо до мястото на увреждането, т.е. в стволската тригемино-фациална верига. Това е в съгласие с липсата на пълно възстановяване на синаптичния вход към моторното ядро на лицевия нерв, и може да обясни слабо изразения ефект на ипсилатералната асиметрична стимулация при смесената нервна увреда.

Хипотетичен механизъм на действие на ипсилатералната асиметрична вибрисна стимулация.

Като имаме предвид гореизложеното ние предлагаме следният хипотетичен обобщен модел на механизма, по който се осъществяват

благоприятните ефекти на испилатералната асиметрична вибрисна стимулация:

1. При изолирана лицева нервна увреда без стимулация двигателният дефицит на вибрисната мускулатура (компенсиран частично от други мускулни групи, напр. мускулите на главата и шията) не е достатъчен за да промени съществено характера на сетивната информация постъпваща от вибрисния апарат по системата на троичния нерв. Централният генератор на вибрисни двигателни модели (VCPG) не изменя съществено активността си, стволният тригемино-фациален кръг с положителна обратна връзка остава подтиснат и в крайна сметка това води до масово синхронно активиране на различните групи мотоневрони в ядрото на лицевия нерв. Синхронизираната мотоневронна активност от своя страна стабилизира дисфункционалните нервно-мускулни синапси, които са следствие от аберантната реинервация на мускулите мишени.

2. Интензивното асиметрично дразнене на вибрисния апарат представлява сигнал, който посредством висши корови и подкорови кръгове променя активността на VCPG, като превключва режима на движение на мустачките от симетрично размахване към фовеално, което е свързано с асинхронната активация на по-малки групи моторни единици. Едновременно с това променената активност на VCPG позволява интензивното дразнене да преодолее подтискането на тригемино-фациалната дъга което води до изолирано асинхронно разреждане на моторните единици в системата на лицевия нерв по подобие на сухожилните рефлексии в скелетната мускулатура. Асинхронната активация на моторни единици усилва синаптичната конкуренция и дестабилизира и елиминира дисфункционалните мионеврални синапси. От своя страна подобреният модел на реинервация води по механизма на обратната връзка до „преобучение” на системите регулиращи вибрисните движения и води до „изработването” и стабилизирането на нови, адекватни на промените в инервацията на таргетните мускули, модели на активация на мотоневроните. Към тези ефекти се добавят и евентуалните благоприятни ефекти от масажа на меките тъкани на мустачковата възглавничка и подобрената трофика на мотоневроните в ядрото на лицевия нерв.

3. В условията на същестранна сензорна аблация (екстирпация на подочничния нерв) стимулацията не може да измени активността на веригите контролиращи вибрисната двигателна система. Влошените електрофизиологични условия, при които функционират лицевите мотоневрони, и евентуалното подтискане на интрамускулното разклоняване допълнително увреждат функционирането на вибрисната двигателна система. Възстановяването на сензорния вход (едновременна увреда и зашиване на лицевия и подочничния нерв) води до известно подобрение от приложението на асиметрична стимулация, но нарушенията

в тригемино-фациалната сензо-моторна дъга ограничават ефекта ѝ и не позволяват пълноценно функционално възстановяване.

4. Ключов за подобрената реинервация е процесът на синаптична конкуренция и елиминация, който коригира дефектите на аберантната реинервация. В този контекст екстензивното колатерално и интрамускулно аксонално пъпкуване и разклоняване не само не са вредни, но и са необходими за да осигурят максимално възстановяване на свързаността на лицевите мотоневрони с таргетната мускулатура.

Този модел не претендира за изчерпателност, но позволява коригирането на съществуващите и създаването на нови стимулационни протоколи, които да го тестват и да изяснят нерешените въпроси. Примерен протокол за третирането на периферна нервна увреда, съобразен с модела, би трябвало да осигурява:

1. Максимално възстановяване на анатомичната свързаност между неврони и периферия посредством оптимизиране на процесите на аксонален растеж и разклоняване.

2. Оптимално възстановяване на сензорния дефицит (при смесена нервна увреда).

3. Интензифициране на синаптичната конкуренция и елиминация посредством асиметрична стимулация или друга форма на десинхронизация на мотоневроналната активност.

4. Стабилизиране на подобрената реинервация и възстановяване на функцията посредством „преобучение” на регулаторните нервни кръгове.

Тъй като аксоналният растеж и разклоняване са стабилни процеси, които се повлияват само от значителни изменения в средата на растящите аксони, то ключов момент за възстановяването на двигателна функция е корекцията на сензорния дефицит.

Смятаме, че посредством експерименти, съобразени с тези принципи, е възможно да се изяснят нервните пътища за осъществяване на описаните ефекти, както и по какъв начин посоченият механизъм повлиява невробиологията на взаимодействието между тези нервни кръгове и на синаптичната елиминация и конкуренция. Отговорите на тези въпроси могат да позволят както разработването на нови по-ефективни подходи за третирането на периферната и централната аксонална увреда, така и транслирането на тези протоколи в терапевтични методи за нуждите на хуманната медицина.

Изводи

1. Мануалната стимулация на мустачковата възглавничка от страната на нервната увреда подобрява функционалното възстановяване след прекъсване и съединяване на лицевия нерв при плъх.
2. Възстановяването на вибрисна двигателна функция не зависи от интензитета на колатералното аксонално разклоняване. Този феномен е ключов за реинервацията и възстановяването на моторните единици и може да бъде повлиян експериментално само при сериозна промяна в непосредствената околност на растящия аксон.
3. Ключово значение за възстановяването на функцията има модела на реинервация на мускулите мишени. При всички животни, с подобрение в биометричните показатели на вибрисната двигателна активност е налице относително намаление на фракцията на аномалните полиинервирани моторни плочки в засегнатите мускули.
4. Подпомогнатото чрез мануална стимулация възстановяване на двигателна активност след увреда на лицевия нерв изисква интактни сетивни пътища.
5. При интактен сензорен вход мануалната стимулация възпрепятства деаферентацията на мотоневроните в ядрото на лицевия нерв.
6. Мануалната стимулация на мустачковата възглавничка и форсираната свръхупотреба на същестранните вибриси имат сходни благоприятни ефекти и по същество представляват форми на същестранна асиметрична сензорна стимулация на мустачките.
7. Когато сетивната обратна връзка посредством подочничния нерв е увредена и оставена да регенерира асиметричната сензорна стимулация не повлиява деаферентацията.
8. Асиметричната сензорна стимулация подобрява модела на реинервация и способства за възстановяването на адекватна вибрисна функция посредством локално въздействие върху меките тъкани и централно обусловен механизъм.
9. Водещо значение има централният механизъм, който вероятно включва усилване на синаптичната конкуренция и елиминация на дисфункционалните синапси в мускулите мишени поради десинхронизация в мотоневронната активност, посредством, обусловена от сетивния вход, промяна във функционирането на контролни нервни кръгове.
10. Възпрепятстването на деаферентацията при интактни сетивни пътища и ефектите от локалното въздействие върху меките тъкани имат вероятно второстепенно значение.
11. Умерената късна изоморфна астроглиоза след прекъсване и зашиване на лицевия нерв вероятно е израз на интензивно протичащи процеси на синаптично ремоделиране в ядрото на лицевия нерв.

12. Алгоритъмът за морфологично филтриране (Top-Hat Opening by reconstruction), използван от нас при обработката на образите получени чрез широкополева епифлуоресцентна микроскопия, позволява автоматизацията и получаването на надеждни резултати при околичествяването на синаптофизин и на други структури и антигени с подобен грануларен изглед.

Справка за приносите на дисертационния труд

1. Извършен е задълбочен морфо-функционален анализ на два метода за постоперативно неинвазивно третиране на увредения лицев нерв при плъхове (мануална стимулация на денервираните вибрисни мускули и отглеждане в обогатена среда за живот), като е потвърдено значението на асиметричната мануална сензорна стимулация за възстановяването на адекватна двигателна функция. При това се потвърждава, че не погрешното насочване на аксонални колатерали, а качеството на реинервация в таргетната мускулатура е водещо за възстановяването на двигателната функция.

2. За първи път е демонстриран количествено трайният дефицит на синаптичния вход към лицевите мотоневрони и изразената астроглиоза в ядрото на лицевия нерв два месеца след лицева нервна увреда при плъхове. Приведени са количествени доказателства, че мануалната стимулация на мустачковата възглавничка от страната на увредата противодейства на загубата на синапси.

3. За първи път е показано, че качеството на реинервация на мускулите мишени и възстановяването на вибрисната двигателна функция посредством мануална стимулация след увреда на лицевия нерв зависи от интегритета на сетивния вход.

4. Извършен е задълбочен морфо-функционален анализ на ефектите от мануалната стимулация на мустачковата възглавничка от страната на увредата и пасивната вибрисна сензорна стимулация в условията на едновременна двигателна и сетивна увреда, т.е. на лицевия и подочничния нерв, като са демонстрирани благоприятните ефекти и на двата вида стимулация, въпреки че в тези условия възстановяването на двигателната функция не е пълноценно, сравнено с изолираната двигателна увреда.

5. За първи път е демонстриран количествено трайният дефицит на синаптичния вход към лицевите мотоневрони в условията на едновременна двигателна и сетивна увреда и е показано, че стимулацията в условията на увреден, макар и възстановяващ се, сетивен вход не може да противодейства на загубата на синаптични терминали в ядрото на лицевия нерв.

6. Въз основа на резултатите от експериментите и анализа на литературата са изтъкнати сходствата във ефектите на различни методи за асиметрична ипсилатерална стимулация. Предложена е хипотеза за водещ централен механизъм, по който тази група методи осъществяват

благоприятното си въздействие върху качеството на реинервация и възстановяването на вибрисната двигателна функция:

а) Интензивното асиметрично дразнене на вибрисния апарат променя активността на VCPG посредством висши корови и подкорови кръгове;

б) Моделът на движение на мустачките се превключва от симетрично размахване към фовеално, което е свързано с асинхронната активация на по-малки групи моторни единици; променената активност на VCPG позволява интензивното дразнене да преодолее подтискането на тригемино-фациалната дъга което води до изолирано асинхронно разреждане на моторните единици в системата на лицевия нерв по подобие на сухожилните рефлексии в скелетната мускулатура;

в) Асинхронната активация на моторни единици усилва синаптичната конкуренция и дестабилизира и елиминира дисфункционалните мионеврални синапси;

г) Подобреният модел на реинервация води по механизма на обратната връзка до „преобучение” на системите регулиращи вибрисните движения и води до „изработването” и стабилизирането на нови, адекватни на промените в инервацията на целевите мускули, модели на активация на мотоневроните;

д) Масажът на меките тъкани на мустачковата възглавничка и подобреният трофика на мотоневроните в ядрото на лицевия нерв допълват благоприятните ефекти от подобренията реинервация на мускулите мишени.

Предложен е списък от критерии, на които един протокол за проверка на посочената хипотеза би трябвало да отговаря:

i) Максимално възстановяване на анатомичната свързаност между неврони и периферия посредством оптимизиране на процесите на аксонален растеж и разклоняване.

ii) Оптимално възстановяване на сензорния дефицит (при смесена нервна увреда).

iii) Интензифициране на синаптичната конкуренция и елиминация посредством асиметрична стимулация или друга форма на десинхронизация на мотоневроналната активност.

iv) Стабилизиране на подобренията реинервация и възстановяване на функцията посредством „преобучение” на регулаторните нервни кръгове.

7. Адаптиран и предложен е метод, базиран на математическия морфологичен анализ на дигитални образи, който се състои от:

а) Определяне на горна граница на радиуса на маркираните частици посредством дигитална гранулометрия.

б) Премахване на всички обекти с радиус по-малък от определената горна граница и създаване на образи на «фона» посредством последователно приложение на « Минимум филтър» и морфологична реконструкция на деградираните от филтъра образи.

с) Екстрахиране на всички профили с радиус по-малък или равен на определената горна граница чрез дигитална субтракция на образите на „фона” от оригиналните образи.

д) Създаване на черно-бели (двоични) образи - „маски” на положителните профили чрез автоматично определяне на праг на сивия цвят (thresholding).

е) Разделяне на докосващите се профили (при нужда) чрез „вододелен” (watershed) алгоритъм.

ф) Автоматично измерване на различни морфометрични характеристики на маркираните профили върху двоичните образи.

г) Дефиниране на перисоматични области на интерес.

h) Автоматично измерване на брой и линейна плътност на перисоматичните синапси;

Този метод позволява бързо автоматизирано и надеждно измерване на:

а) брой, размери, площ, обемна фракция на синаптофизин-положителните частици;

б) при комбинация с ръчна селекция или ретроградно маркиране на телата на невроните определяне на брой и линейна плътност на перисоматичните синапси;

с) при съответна модификация методът е приложим за количествен анализ и на флуоресцентни образи на други субстрати с гранулиран изглед.

8. Предложен е метод за определяне на обемната фракция на положителните за GFAP клетки, който се състои от:

а) Едновременно заснемане на „позитивен” и „негативен” образ през два различни филтъра на епифлуоресцентния микроскоп.

б) Обработка на „позитивните” и „негативните” образи чрез алгоритъм „търкаляща се топка” („Rolling ball”) за премахване на фона.

с) Превръщане на получените образи в черно бели.

д) Премахване на „негативното” светене чрез дигитална субтракция на „негативните” образи от „позитивните”.

е) Окончателно минимизиране на фоновия шум чрез премахване на единичните пиксели от получените образи.

Този метод позволява бързо автоматизирано и надеждно измерване на площта и обемната фракция на GFAP позитивните структури върху дигитални образи от серийни срезове през ядрото на лицевия нерв или други части от ЦНС. При съответна модификация методът е приложим за количествен анализ и на други пролиферативни процеси.

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Bendella, H., **Pavlov, S.**, Grosheva, M., Irintchev, A., Angelova, S., Merkel, D., Sinis, N., Kaidoglou, K., Skouras, E., Dunlop, S., Angelov, D., 2011. Non-invasive stimulation of the vibrissal pad improves recovery of whisking function after simultaneous lesion of the facial and infraorbital nerves in rats. *Experimental Brain Research* 212, 65-79-79.
2. **Pavlov, S.P.**, Grosheva, M., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Irintchev, A., Skouras, E., Angelova, S.K., Kuerten, S., Sinis, N., Dunlop, S.A., Angelov, D.N., 2008. Manually-stimulated recovery of motor function after facial nerve injury requires intact sensory input. *Exp. Neurol.* 211, 292-300.
3. Skouras, E., Merkel, D., Grosheva, M., Angelova, S.K., Schiffer, G., Thelen, U., Kaidoglou, K., Sinis, N., Igelmund, P., Dunlop, S.A., **Pavlov, S.**, Irintchev, A., Angelov, D.N., 2009. Manual stimulation, but not acute electrical stimulation prior to reconstructive surgery, improves functional recovery after facial nerve injury in rats. *Restorative Neurology and Neuroscience* 27, 237-251.

Научни доклади и съобщения, изнесени на научни конференции, конгреси и симпозиуми

1. **Pavlov S.**, Ceynowa M, Guntinas O, Popratiloff S, Streppel M, Irintchev A, Angelov DN “Reduced astrogliosis and increased axosomatic input to facial motoneurons promote recovery of whisking after mechanical stimulation of denervated vibrissal muscles in rats.” VII Международен Симпозиум по Клинична Анатомиа, Варна 12-15 Октомври 2006. *Scripta Scientifica Medica*, 2006, vol. 38 Supplement 2, p. 32
2. **Pavlov S.**, Grosheva M., Guntinas-Lichius O., Irintchev A., Sinis N., Dunlop S., Angelov D. Manually-stimulated recovery of motor function after facial nerve injury requires intact sensory input. Anatomische Gesellschaft 103rd Annual Meeting, Innsbruck, Austria March 14 – 17, 2008. Lectureabstracts 103rd Annual Meeting Innsbruck 2008 - DOI 10.3337/anatges.2008.0005, Abstract Nr.:42.
3. Schweigert P., Engenieva E., **Pavlov S.**, Guntinas-Lichius O., Angelova S., Radeva V., Angelov D. Manual stimulation of the suprahyoid-sublingual region diminishes poly-innervation of the motor end-plates and improves recovery of function after hypoglossal nerve injury in rats. Anatomische Gesellschaft 103rd Annual Meeting, Innsbruck, Austria March 14 – 17, 2008. Posterabstracts 103rd Annual Meeting Innsbruck 2008 - DOI 10.3337/anatges.2008.0006, Abstract Nr.:135
4. Sinis N., Guntinas-Lichius O., **Pavlov S.**, Schaller H., Angelov D. Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. Anatomische Gesellschaft 103rd Annual Meeting, Innsbruck, Austria March 14 – 17, 2008. Posterabstracts

103rd Annual Meeting Innsbruck 2008 - DOI 10.3337/anatges.2008.0006, Abstract Nr.:137

5. **Pavlov S.**, Grosheva M., Guntinas-Lichius O., Irintchev A., Sinis N., Dunlop S., Angelov D. Intact sensory input is crucial to the recovery of whisking after manual stimulation of denervated vibrissal muscles in rats. VIII International Symposium of Clinical Anatomy, Varna, October 10-12, 2008. Scripta Scientifica Medica, 2008; vol. 40 Supplement 1, p. 76.
6. Bendella H., **Pavlov S.**, Grosheva M., Merkel D., Irintchev A., Dunlop S., Angelov D. Sequential sensory and mechanical stimulation of rat whisker pad improves recovery of whisking function after combined lesion of the trigeminal and facial nerves. 104th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, March 27-30, 2009, Antwerpen, Belgium Posterabstracts - Joint Meeting 2009 Anatomische Gesellschaft - Nederlandse Anatomen Vereniging - 104th Annual Meeting Antwerpen 2009 - DOI 10.3337/anatges.2009.0009, Abstract Nr.:88.
7. **Pavlov S.**, Grosheva M., Bendella H., Minkov M., Angelov D.N. Effect of Altered Trigeminal Input and Manual Stimulation of Denervated Muscles on the Recovery of Whisking after Facial Nerve Transection and Anastomosis in Adult Rats. XIX National Congress of Bulgarian Anatomical Society with international participation, Pleven, May 29-31 2009.
8. **S. Pavlov**, M. Grosheva, A. Irintchev, D. Angelov Morpho-Functional Correlates of Restored Vibrissal Whisking after Mechanical Stimulation of Denervated Whiskerpad Muscles. Anatomist 2009, 10th Congress of European Association of Clinical Anatomy, Istanbul, September 2-5, 2009. Surgical & Radiologic Anatomy, September 2009, Volume 31 Supplement, pp 62-63
9. **S. Pavlov**, H. Bendella, M. Grosheva, A. Irintchev, E. Skouras, S. K. Angelova, D. Merkel, N. Sinis, K. Kaidoglou, S. A. Dunlop, M. Minkov, D. Angelov. Morphological correlates of recovering whisking after simultaneous lesion of the facial and trigeminal nerves in rats – effects of non invasive stimulation of the vibrissal pad. VIII Национална Конференция по Антропология и IV Копривщенски Морфологични Дни, Копривщица, 4-6 Юни 2010.
10. **Pavlov S. P.**, Grosheva M., Bendella H., Dunlop S. A., Angelov D. N. Advanced morphological image processing for the segmentation and quantitative analysis of anti-synaptophysin stained epifluorescence microscopy images. XX National Congress of the Bulgarian Anatomical Society and IX International Symposium of Clinical Anatomy, Varna, September 30th - October 2nd, 2011, Scripta Scientifica Medica, Volume 43 (2), 2011, p 97

Благодарност

Благодаря на проф. д-р Дойчин Ангелов за доверието и възможността да работя заедно с него и висококвалифицираните сътрудници от екипа му в една толкова интересна сфера на науката, както и за безценните съвети и помощ по време на цялото ни сътрудничество.

На доц. Минко Минков за съветите и за смелостта, която ми вдъхваше през цялото време.

Тази работа не би била възможна без ценната помощ от страна на специалистите по ото-рино-ларингология д-р Maria Grosheva и проф. Michael Streppel, които извършиха всички хирургични интервенции върху животните.

Благодаря на д-р Сребрина Ангелова за количествената оценка на вибрисната функция и реинервацията на мускулите мишени.

На всички студенти (Marcin Ceynowa, Habib Bendella, Kathrin Glück, Jürgen Rahn) и лаборанти (Diana Bösel, Dirkje Felder, Nadin Lange, Madlen Strauss, Lena Wilken, Claudia Zyntek) от екипа на проф. Ангелов за безупречните грижи за експерименталните животни и за количествените измервания на вибрисната функция, на колатералното аксонално разклоняване и на реинервацията на мускулите мишени.

На Janina Ankerne, лаборант от екипа на проф. Ангелов за заснемането и количествената оценка на конфокалните образи.

На проф. Jürgen Коевке за топлото посрещане в Анатомичния център на Университета в Кьолн.

На доц. Георги Маринов за съветите и подкрепата, и за това, че ме въведе в науката.

На моите учители доц. д-р Савка Бакърджиева, доц. д-р Йонко Йонков и д-р Здравка Харизанова за безкрайната всеотдайност, с която ме учиха на анатомия, хистология и цитология.

На всички колеги от катедрата по Анатомия, хистология и ембриология на Медицински Университет, Варна за това, че се натовариха допълнително с учебни часове за да ми освободят време, в което да работя по дисертацията си.

На Даниела Илиева и Живка Андреева за помощта и съветите по оформлението на дисертационния труд.

На съпругата и синовете си, които често лишавах от внимание, благодаря за търпението, вярата и обичта.

Благодаря на баща ми и майка ми за това, че винаги са вярвали в мен и са подкрепяли избора ми да се посветя на медицинската наука.