

# NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Jasna Jan i , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandar Malikovi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dinka Muci , profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

## “ ANALIZA MIKROANATOMSKIH, HISTOLOŠKIH I IMUNOHISTOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA GANGLIONA GENICULI FACIJALNOG ŽIVCA OVEKA ”

Kandidat: Mr sci dr Aleksandra Doži

Mentor: Doc. dr Mila etkovi -Milisavljevi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor: Prof. dr Vaso Antunovi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, u penziji

Imenovana komisija je prou ila doktorsku disertaciju i podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija “ **Analiza mikroanatomskih, histoloških i imunohistohemijskih karakteristika gangliona geniculi facijalnog živca oveka** ” kandidata dr Aleksandre Doži je napisana na 145 strana na kojima je prikazano 31 tabela, 19 grafikona, 14 crteža i 130 originalnih fotografija, kao i 250 referenci iz savremene i zna ajne nau ne literature. Disertacija sadrži slede a poglavlja: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaklju ke, literaturu i spisak skra enica.

U **Uvodu** su prikazani osnovni podaci o mikroneuromorfološkim i histološkim karakteristikama facijalnog živca i genikulatnog gangliona. Opisani su neuropeptidi od značaja za sam ganglion: supstanca P (SP), peptid kodiran genom za kalcitonin (CGRP), kao i ostali proteini: S100 protein, sinaptofizin (Syn), neuron-specifična enolaza (NSE) i protein gen produkta 9.5 (PGP9.5).

Sledećim su prikazani podaci o mastocitima kao medijatorima nocicepcije.

Posebna pažnja posvećena je opisu mikromorfoloških karakteristika arterija genikulatnog gangliona i facijalnog živca, kao i bazi njihove karakteristike embrionalnog razvoja gangliona i živca.

**Ciljevi istraživanja** su precizno definisani:

1. odrediti mikroanatomske karakteristike *ganglionu geniculi* (oblik, dimenzije) i njegove odnose sa okolnim strukturama;
2. odrediti zastupljenost i brojnost ganglijskih elija i klasifikovati ih, kao i broj satelitskih elija, i zastupljenost vezivno- tkivne komponente u *ganglionu geniculi*, na osnovu primene histohemijskih, imunohistohemijskih i morfometrijskih metoda ispitivanja;
3. proučiti vaskularizaciju *ganglionu geniculi* na osnovu
  - određivanja periganglijske arterijske i intraganglijske vaskularne mreže (ekspresije CD34-vaskularnog markera),
  - određivanja porekla arterije, njenog kalibra i odnosa sa ganglionom i stablom nerva, na njena grananja i vaskularnih anastomoza;
4. odrediti imunohistohemijsku ekspresiju u ganglijskim elijama

U poglavlju **Materijal i metode** jasno su definisani metodologija i dizajn studije. Uzorci genikulatnih gangliona i facijalnih nerava, osoba bez znakova promena na strukturama centralnog nervnog sistema, su dobijeni tokom regularnih obdukcija na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Zadate histološke i imunohistohemijske karakteristike genikulatnih gangliona ispitivane su svetlosnim mikroskopom.

**Rezultati** su izneti u četiri poglavlja koji su u saglasnosti sa postavljenim ciljevima istraživanja. U prvom poglavlju iznete su mikroanatomske karakteristike *ganglionu geniculi* (oblik, dimenzije) i njegovi odnosi sa okolnim strukturama i rastojanja do njih. U drugom poglavlju prikazane su mikromorfološke karakteristike periganglijske arterijske vaskularizacije, kao i intraganglijskog vaskularnog sistema. Treće poglavlje posvećeno je histohemijskim, imunohistohemijskim i mernim karakteristikama samog genikulatnog gangliona. U četvrtom poglavlju izneti su rezultati histohemijskih, imunohistohemijskih i mernih karakteristika ganglijskih elija genikulatnog gangliona.

U **Diskusiji** su nau nom analizom dobijenih rezultata pokazane zna ajne karakteristike ispitivanih struktura genikulatnog gangliona i facijalnog nerva od mogu eg zna aja za normalnu funkciju, ali i u razvoju patoloških stanja vezanih za facijalni sistem. Obrazložena je i klini ka relevantnost dobijenih rezultata, kao i mogu nosti za njihovu klini ku primenu. Dobijeni rezultati su detaljno upore eni sa podacima drugih autora. Nažalost, zbog veoma oskudne literature posve ene ovom problemu, zna ajan deo razmatranja usmeren je na pokušaj komentara sopstvenih nalaza i traženja uzroka na enih promena.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata uobli eni su **zaklju ci**, koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve istraživanja.

U poglavlju **Literatura** naveden je spisak od 250 referenci iz savremene i zna ajne nau ne literature, koje su citirane u radu, a na kraju naveden **spisak skra enica** koriš enih u tekstu.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Mikromorfološka istraživanja odnosa krvnih sudova i genikulatnog ganglionu, kao i karakteristike periganglijske arterijske vaskularizacije i intraganglijske vaskularne mreže su bazi na podrška i doprinose razvoju mikrovaskularne dekompresione neurohirurgije i otoloških operacija. Na prou enom materijalu uo eno je da *ganglion geniculi* (GG) vaskularizuje u proseku 1,1 *a. petrosa* (AP). Spoljašnji dijametar AP iznosio je prose no 0,44 mm, dok je njen unutrašnji pre nik iznosio prose no 0,24 mm. AP je prose no bila duga 17,1 mm. AP je davala 1 do 3, prose no 1,6 ganglijske gran ice koje izgra uju periganglijsku i intraganglijsku arterijsku mrežu. Njihovi spoljašnji pre nici su iznosili od 0,018 do 0,056 mm, prose no 0,029 mm. Broj mikrosudova po mikroskopskom polju je varirao od 87 do 143, prose no 99,8. Njihov pre nik se kretao od 5,47  $\mu\text{m}$  do 8,71  $\mu\text{m}$ , prose no 6,84  $\mu\text{m}$  po mikroskopskom polju. Broj ganglijskih elija po mikroskopskom polju je varirao od 20 do 38, prose no 27,4. Prose an odnos ganglijska elija/sudovi, koji je iznosio 1:3,6, govori da je svaka ganglijska elija, na nivou preseka, okružena sa 3,6 mikrosuda.

Najve i broj genikulatnih ganglionu bio je trouglast – 14/20 (70%), zatim su sledili ovalni ganglionu – 5/20 (25%), dok je samo jedan ganglion (5%) bio sastavljen od grupica razbacanih ganglijskih elija u labirintnom delu facijalisa. Pojednostavljeno, pre nik *ganglionu geniculi* je oko 1 mm, a njegova površina preseka ispod 1  $\text{mm}^2$ , dok je obim ganglionu oko 4 mm. Ganglijske elije u ovoj studiji bile su pretežno elipsoidnog oblika. Prose ni dijametar iznosio je  $34,21 \pm 0,69 \mu\text{m}$ , sa rasponom vrednosti od 17,740 do 49,113  $\mu\text{m}$ . Prose ni duži dijametar ganglijske elije bio je  $37,02 \pm 0,79 \mu\text{m}$ , a kra i  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$ . Prose na površina ganglijskih

elija iznosila je  $944,84 \pm 36,93 \mu\text{m}^2$ . Pokazano je da najveći broj pripada srednjevelikim elijama sa dijametrom od 31-40  $\mu\text{m}$  (51/100; 51%), a potom slede male elije sa dijametrom od 15-30  $\mu\text{m}$  (33/100; 33%) i na kraju velike elije dijametra od 41-50  $\mu\text{m}$  (16/100; 16%).

Analiza ekspresije NF-H u ganglijskim elijama pokazala je da 91% elija eksprimira ovaj protein citoskeleta i da je distribucija IR- elija ravnomerna unutar procene slabe, umerene i izrazite IR (oko 30% elija u svakoj podgrupi). Ukupni skor imunoreaktivnosti za NF-H iznosi  $178 \pm 85,5$ .

Supstanca P bila je ekspimirana čak u 70% elija GG prisutnih na poprečnom preseku gangliona, dok 30% elija nije ekspimiralo ovaj neuropeptid. Ukupan proračunati skor IR za supstancu P, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog gangliona, iznosio je  $91,5 \pm 56,41$ . Statistička analiza je pokazala da su ganglijske elije koje ekspimiraju SP, u proseku značajno manje po dijametru, obimu i površini u odnosu na ganglijske elije koje ne ekspimiraju SP.

CGRP se ekspimirao u 62% elija GG, dok 38% elija nije ekspimiralo ovaj neuropeptid. Ukupan proračunati skor IR za CGRP, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog gangliona, iznosio je  $81,62 \pm 40,45$ . Statistička analiza je pokazala da između CGRP+ i CGRP- elija nema razlike u njihovoj površini, ali da su CGRP+ elija imale manji dijametar (veći i prosečni) od CGRP- elija.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Hirurška anatomija i odnosi genikulatnog gangliona sa okolnim strukturama su od izuzetnog značaja u hirurgiji bubne duplje i sadržaja unutrašnjeg slušnog hodnika (*Miller et al., 2003; Ulug et al., 2005a; Lee et al., 2006; Todd et al., 2006*). Disekcione analize odnosa GG sa mernim podacima su retke i nepotpune (*Ulug, 2009*). Kao dobar putokaz za pronalaženje pozicije GG tokom operacije je veliki petrozni nerv koji pouzdano vodi ka ganglionu. Ovo istraživanje je pokazalo da je distanca od mesta odvajanja velikog petroznog nerva od stabla timpani nog dela facijalnog nerva do GG prosečno bila 1,24 mm. Jedno istraživanje pokazuje da je bezbedna zona, bez oštećenja puža, za pristup elementima unutrašnjeg slušnog hodnika oko 10 mm upolje od GG i kolena facijalnog nerva (*Lan et al., 2010*). Processus cochleariformis je u literaturi najčešće spominjana struktura koja je po otvaranju bubne duplje od velike pomoći i manje iskusnim hirurzima. Rastojanje od ovog nastavka do mesta nastanka velikog petroznog nerva Ulug navodi da je prosečno 5,84 mm [*Ulug, 2009*]. Navedeni rezultati govore da je rastojanje od GG do centralnog dela vrha kohleariformnog nastavka prosečno bilo 5,53 mm. Todd navodi da je rastojanje od gornjeg

dela promontorijuma do po etka velikog petroznog živca 1,8 do 2,8 mm, a do GG 2 do 32 mm (Todd, 2007). Kao deo analiza ove teze mereno je rastojanje od sredine promontorijuma do GG, koje je iznosilo prose no 7,63 mm, što je približno navedenim rezultatima imaju i u vidu da je sam promontorijum veli ine oko 5 mm.

Opisi vaskularizacije genikulatnog ganglionia su retki i uglavnom spominju petroznju arteriju (Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). *A. petrosa* (AP), grana *a. meningeae mediae* (AMM), koja polazi iz prvog segmenta *a. maxillaris*, je na našem materijalu uvek postojala i uvek je bila normalno razvijena, prose nog pre nika od 1,3 mm. Dobijeni rezultati su u celini sli ni podacima navedenih autora (Blunt, 1954; Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). Prose ne vrednosti spoljašnjih pre nika i dužina petroznih arterija u obe studije su bile sli ne: 0,44:0,50 mm i 17,1:18 mm. Arterija je prilazila velikom petroznom nervu i ulazila u njegov koštani hijatus ili je prolazila kroz otvor na kosti ispred i upolje od GG da bi pristupila timpani nom segmentu facijalnog nerva. Uo eno je da je prose no 99,8 mikrosudova na svakom mikroskopskom polju, na uve anju x400, veli ine merenog polja od 341,7  $\mu\text{m}$  x 250,0  $\mu\text{m}$ . Ovaj rezultat je ve i od prikaza u nekim drugim istraživanjima, gde je prose na vrednost bila 8,5 suda po mikroskopskom polju (Blunt, 1996). Druga grupa autora (Clark, 1965), koji su koristili bojenje bakrom na 200 polja (svako veli ine 1/200 dela in a), naveli su rezultat od 12 suda po polju. U ovoj studiji primenjena je metoda mnogo preciznija i pouzdanija, specifi na za ozna avanje endotelnih elija krvnih sudova, imunohistohemijsko bojenje na CD34 marker (Blunt, 1954; Chan and Lowe, 2002; Bala et al., 2012). Opšta karakteristika tela neurona u perifernom i centralnom nervnom sistemu, kao i u GG je bogata arterijska vaskularizacija. Razlog je nivo metabolizma koji je mnogo viši u telima neurona nego u nastavcima, koji uslovljava i intenzitet vaskularizacije (Carpenter, 1991; Van Heertum et al., 2010).

Razbacane aberantne ganglijske elije opisuju se relativno esto u moždanim i spinalnim senzornim ganglijama (Petters, 1935; Carmel and Stein, 1969; Nawar, 1976; Nawar et al., 1980; Marinkovi et al., 2011). U najve em broju navedenih uzoraka, pored postojanja *ganglionia geniculi* u kolenu facijalnog nerva, akcesorne ganglijske elije nalazile su se istovremeno u *n. intermedius* – u 13/20 (65%) slu ajeva, dok su se preostali slu ajevi odnosili na prisustvo akcesornih ganglijskih elija i u *n. intermedius* i u *n. petrosus major* (5/29; 25%), što je u skladu je sa opisanom studijom Gaceka (Gacek, 1980).

U ovoj studiji, najve i broj ganglionia imao je umerenu celularnost, izraženu semikvantitativnom procenom kao 50-70% ukupne površine preseka *ganglionia geniculi*. Ovi rezultati indirektno su u skladu sa podacima koji su pokazali da polovina volumena *ganglionia geniculi* pripada elijskoj teritoriji (242.990  $\mu\text{m}^3$ ), a druga nezatno manja polovina intercelularnom prostoru (231.977  $\mu\text{m}^3$ ) (Nawar et al., 1980). Ganglijske elije u ovoj studiji bile su

pretežno elipsoidnog oblika. Prikazani rezultati u skladu su sa studijom Moriyame i sar. u pogledu blago elipsoidnog oblika ganglijskih elija (*Moriyama et al., 1995*). Ukoliko se ganglijske elije, u odnosu na prose ni dijametar, klasifikuju u male, srednje i velike, pokazano je da najveći broj pripada srednjevelikim elijama sa dijametrom od 31-40  $\mu\text{m}$  (51/100: 51%), a potom slede male elije sa dijametrom od 15-30  $\mu\text{m}$  (33/100; 33%) i na kraju velike elije dijametra od 41-50  $\mu\text{m}$  (16/100; 16%). Nalazi Nawara su bliži navedenim nalazima od podataka koje je o humanom ganglionu geniculi izneo Van Bruskit (*Nawar et al., 1989*).

Supstanca P bila je eksprimirana čak u 70% elija GG prisutnih na poprečnom preseku gangliona, dok se CGRP eksprimirao u 62% elija GG. Pokazano je da je SP prisutna u centralnim projekcionim vlaknima *n. glossopharingeusa* (*Helke i Hill, 1988*), kao i u terminalnim okrajcima ovog nerva, u *n. tractus solitarii* (*Cuello i Kanazawa 1978; Hokfelt et al 1975*). CGRP imunoreaktivnost je prikazana u ganglijskim elijama i u vlaknima *chordae tympani*. S druge strane, VIP i NPY nisu dokazani u ganglijskim neuronima eksperimentalnih životinja (*Hino et al., 1993*). Za CCK i SST ne postoje podaci u literaturi (*Katsura et al., 2006*).

## **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

1. **Doži A**, Etkovi M, Marinkovi S, Mitrovi D, Grujić M, Milosavljević M. Vascularisation of the geniculate ganglion. *Folia Morphol (Warsz)* 73(4):414-421, 2014.

## **E) Zaključak**

Doktorska disertacija “**Analiza mikroanatomskih, histoloških i imunohistohemijskih karakteristika gangliona geniculi facijalnog živca čoveka**” kandidata dr Aleksandre Doži predstavlja originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na karakteristike krvnih sudova i ganglijskih elija genikulatnog gangliona. Za medicinsku nauku izuzetno je značajno detaljno poznavanje mikroskopskih odnosa *gangliona geniculi*, kao i karakteristike njegovih nutritivnih arterija i vaskularne mreže, jer se danas sve neurohirurške i otološke operacije na ganglionu i njegovoj okolini vrše pod operacionim mikroskopom. Zahvaljujući tome, izbegavaju se jatrogene povrede gangliona i okolnih struktura, a patološki proces se radikalno uklanja ili se definitivno zaustavlja patofiziološki mehanizam, što posebno ističe značaj ove studije. Morfometrijske karakteristike gangliona i njegovih neurona takođe su od velikog značaja u spomenutim hirurškim disciplinama. S druge strane, histološke i biohemijske osobine gustativnih i senzornih neurona u ganglionu od ključnog su značaja za fundamentalnu nauku.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada u skladu sa savremenim principima istraživanja. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega napred navedenog, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veće u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci dr Aleksandre Dožić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 20.06.2016.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Jasna Janićić

Doc. dr Mila Đeković -Milisavljević

---

Prof. dr Aleksandar Maliković

Komentor:

---

Prof. dr Dinka Mucić

Prof. dr Vaso Antunović

---