

# **NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Jasna Jančić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandar Maliković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dinka Mucić, profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

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

Kandidat: Mr sci dr Aleksandra Dožić

Mentor: Doc. dr Mila Četković-Milisavljević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

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

Imenovana komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija “ **Analiza mikroanatomskih, histoloških i imunohistohemijskih karakteristika gangliona geniculi facijalnog živca čoveka** ” kandidata dr Aleksandre Dožić 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 značajne naučne literature. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literaturu i spisak skraćenica.

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 (Sy), neuron-specifična enolaza (NSE) i protein gen produkt 9.5 (PGP9.5).

Slede bazični podaci o mastocitima kao medijatorima nocicepcije.

Posebna pažnja posvećena je opisu mikromorfoloških karakteristika arterija genikulatnog gangliona i facijalnog živca, kao i bazičnih karakteristika 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 ćelija i klasifikovati ih, kao i broj satelitskih ćelija, i zastupljenost vezivno-ćelovne 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, načina grananja i vaskularnih anastomoza;
4. odrediti imunohistohemijsku ekspresiju u ganglijskim ćelijama

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 ćelija genikulatnog gangliona.

U **Diskusiji** su naučnom analizom dobijenih rezultata pokazane značajne karakteristike ispitivanih struktura genikulatnog gangliona i facijalnog nerva od mogućeg značaja za normalnu funkciju, ali i u razvoju patoloških stanja vezanih za facijalni sistem. Obrazložena je i klinička relevantnost dobijenih rezultata, kao i mogućnosti za njihovu kliničku primenu. Dobijeni rezultati su detaljno upoređeni sa podacima drugih autora. Nažalost, zbog veoma oskudne literature posvećene ovom problemu, značajan deo razmatranja usmeren je na pokušaj komentara sopstvenih nalaza i traženja uzroka nađenih promena.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata uobličeni su **zaključci**, koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve istraživanja.

U poglavlju **Literatura** naveden je spisak od 250 referenci iz savremene i značajne naučne literature, koje su citirane u radu, a na kraju naveden **spisak skraćenica** korišćenih u tekstu.

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

Mikromorfološka istraživanja odnosa krvnih sudova i genikulatnog gangliona, kao i karakteristike periganglijske arterijske vaskularizacije i intraganglijske vaskularne mreže su bazična podrška i doprinose razvoju mikrovaskularne dekompresione neurohirurgije i otoloških operacija. Na proučenom materijalu uočeno je da *ganglion geniculi* (GG) vaskularizuje u proseku 1,1 *a. petrosa* (AP). Spoljašnji dijametar AP iznosio je prosečno 0,44 mm, dok je njen unutrašnji prečnik iznosio prosečno 0,24 mm. AP je prosečno bila duga 17,1 mm. AP je davala 1 do 3, prosečno 1,6 ganglijske grančice koje izgrađuju periganglijsku i intraganglijsku arterijsku mrežu. Njihovi spoljašnji prečnici su iznosili od 0,018 do 0,056 mm, prosečno 0,029 mm. Broj mikrosudova po mikroskopskom polju je varirao od 87 do 143, prosečno 99,8. Njihov prečnik se kretao od 5,47  $\mu\text{m}$  do 8,71  $\mu\text{m}$ , prosečno 6,84  $\mu\text{m}$  po mikroskopskom polju. Broj ganglijskih ćelija po mikroskopskom polju je varirao od 20 do 38, prosečno 27,4. Prosečan odnos ganglijska ćelija/sudovi, koji je iznosio 1:3,6, govori da je svaka ganglijska ćelija, na nivou preseka, okružena sa 3,6 mikrosuda.

Najveći broj genikulatnih gangliona bio je trouglast – 14/20 (70%), zatim su sledili ovalni ganglioni – 5/20 (25%), dok je samo jedan ganglion (5%) bio sastavljen od grupica razbacanih ganglijskih ćelija u labirintnom delu facijalisa. Pojednostavljeno, prečnik *gangliona geniculi* je oko 1 mm, a njegova površina preseka ispod 1 mm<sup>2</sup>, dok je obim gangliona oko 4 mm. Ganglijske ćelije u ovoj studiji bile su pretežno elipsoidnog oblika. Prosečni dijametar iznosio je 34,21±0,69  $\mu\text{m}$ , sa rasponom vrednosti od 17,740 do 49,113  $\mu\text{m}$ . Prosečni duži dijametar ganglijske ćelije bio je 37,02±0,79  $\mu\text{m}$ , a kraći 31,39±0,68  $\mu\text{m}$ . Prosečna površina ganglijskih

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

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

Supstanca P bila je ekspimirana čak u 70% ćelija GG prisutnih na poprečnom preseku gangliona, dok 30% ćelija 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 ćelije koje ekspimiraju SP, u proseku značajno manje po dijametru, obimu i površini u odnosu na ganglijske ćelije koje ne ekspimiraju SP.

CGRP se ekspimirao u 62% ćelija GG, dok 38% ćelija 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- ćelija nema razlike u njihovoj površini, ali da su CGRP+ ćelija imale manji dijametar (veći i prosečni) od CGRP- ćelija.

### **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 timpaničnog 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 početka 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 prosečno 7,63 mm, što je približno navedenim rezultatima imajući u vidu da je sam promontorijum veličine oko 5 mm.

Opisi vaskularizacije genikulatnog ganglionu su retki i uglavnom spominju petroznu arteriju (Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). A. petrosa (AP), grana a. meningae mediae (AMM), koja polazi iz prvog segmenta a. maxillaris, je na našem materijalu uvek postojala i uvek je bila normalno razvijena, prosečnog prečnika od 1,3 mm. Dobijeni rezultati su u celini slični podacima navedenih autora (Blunt, 1954; Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). Prosečne vrednosti spoljašnjih prečnika i dužina petroznih arterija u obe studije su bile slične: 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 timpaničnom segmentu facijalnog nerva. Uočeno je da je prosečno 99,8 mikrosudova na svakom mikroskopskom polju, na uvećanju x400, veličine merenog polja od 341,7  $\mu\text{m}$  x 250,0  $\mu\text{m}$ . Ovaj rezultat je veći od prikaza u nekim drugim istraživanjima, gde je prosečna vrednost bila 8,5 suda po mikroskopskom polju (Blunt, 1996). Druga grupa autora (Clark, 1965), koji su koristili bojenje bakrom na 200 polja (svako veličine 1/200 dela inča), naveli su rezultat od 12 suda po polju. U ovoj studiji primenjena je metoda mnogo preciznija i pouzdanija, specifična za označavanje endotelnih ćelija krvnih sudova, imunohistohemijsko bojenje na CD34 marker (Blunt, 1954; Chan and Lowe, 2002; Balać 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 ćelije opisuju se relativno često u moždanim i spinalnim senzornim ganglijama (Petters, 1935; Carmel and Stein, 1969; Nawar, 1976; Nawar et al., 1980; Marinković et al., 2011). U najvećem broju navedenih uzoraka, pored postojanja ganglionu geniculi u kolenu facijalnog nerva, akcesorne ganglijske ćelije nalazile su se istovremeno u n. intermediu – u 13/20 (65%) slučajeva, dok su se preostali slučajevi odnosili na prisustvo akcesornih ganglijskih ćelija i u n. intermediu i u n. petrosu majoru (5/29; 25%), što je u skladu sa opisanom studijom Gaceka (Gacek, 1980).

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

pretežno elipsoidnog oblika. Prikazani rezultati u skladu su sa studijom Moriyame i sar. u pogledu blago elipsoidnog oblika ganglijskih ćelija (*Moriyama et al., 1995*). Ukoliko se ganglijske ćelije, u odnosu na prosečni dijametar, klasifikuju u male, srednje i velike, pokazano je da najveći broj pripada srednjevelikim ćelijama sa dijametrom od 31-40  $\mu\text{m}$  (51/100: 51%), a potom slede male ćelije sa dijametrom od 15-30  $\mu\text{m}$  (33/100; 33%) i na kraju velike ćelije 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% ćelija GG prisutnih na poprečnom preseku gangliona, dok se CGRP eksprimirao u 62% ćelija 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 ćelijama 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. **Dožić A**, Ćetković M, Marinković S, Mitrović D, Grujičić M, Mićović M, Milisavljević 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 Dožić predstavlja originalan naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na karakteristike krvnih sudova i ganglijskih ćelija 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 operaciju 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 krucijalnog 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, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta 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 Jančić

Doc. dr Mila Četković-Milisavljević

---

Prof. dr Aleksandar Maliković

Komentor:

---

Prof. dr Dinka Mucić

Prof. dr Vaso Antunović

---