

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.04.2024. godine, broj 19/XXIII-4/3-JB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom: „**Analiza mikromorfoloških i imunohistohemijskih karakteristika gornjeg vratnog simpatičkog gangliona čoveka**“ kandidata dr Jelene Boljanović, zaposlene na Institutu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Milan Milisavljević, a komentor prof. dr Milan Latas.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Dr Ana Starčević, docent, Institut za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Darko Laketić, docent, Institut za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Dr Milica Velimirović Bogosavljević, docent, Institut za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. Dr Aleksandra Dožić, docent, Institut za anatomiju, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. Dr Zdravko Vitošević, redovni profesor, Institut za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini, Kosovska Mitrovica

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije članovi Komisije za ocenu završene doktorske disertacije podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu sledeći

### IZVEŠTAJ

#### A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Boljanović „**Analiza mikromorfoloških i imunohistohemijskih karakteristika gornjeg vratnog simpatičkog gangliona čoveka**“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati istraživanja, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija je napisana na 74 strane, sa 93 slike i 25 tabela. U poslednjem poglavlju je prikazan pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 66 reference. Doktorska disertacija takođe ima i zahvalnicu, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, podatke o komisiji, spisak publikacija koje su proistekle iz doktorske disertacije i biografiju kandidata.

U **uvodu** su sažeto opisane neuroanatomske karakteristike autonomnog nervnog sistema, kako njegovog centralnog tako i perifernog dela. Posebno su istaknute anatomske karakteristike gornjeg vratnog simpatičkog gangliona (GVSG). Mikromorfološka organizacija nervnog sistema je u skraćenom obliku navedena takođe u uvodu. Mikromorfološka struktura gornjeg vratnog simpatičkog gangliona je centralni i najšire opisani deo uvodnog dela teze. Od ćelija prisutih u ganglionu izneti su osnovni podaci o

glijalnim satelitskim ćelijama (GŚĆ) i mastocitima. Posebna pažnja poklonjena je ganglijskim nervnim ćelijama (GNĆ) u gornjem vratnom ganglionu. Opisana je njihova imunoreaktivnost na neuropeptid Y (NPY), supstancu P (SP), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), peptid povezan sa kalcitoninskim genom (calcitonin gene-related peptide - CGRP) i somatostatin (SOM). Objašnjena je i  $\beta$ -triptaza mastocita, kao i endotelni marker CD34 krvnih sudova. Takođe je naznačena topografska organizacija neurona u samom ganglionu i značaj gornjeg vratnog simpatičkog gangliona u kliničkoj praksi.

**Ciljevi istraživanja** su precizno izneti. Sastoje se od ispitivanja mikromorfoloških karakteristika periganglijske arterijske vaskularizacije i karakteristika intraganglijske vaskularne mreže. Takođe, ciljevi su i ispitivanje karakteristike kapilarne mreže i broj mastocita u gornjem i donjem segmentu GVSG praćenjem imunoreaktivnosti na vaskularni endotelni marker CD34 i mastocitnu triptazu (MCTrip). Naredni ciljevi su ispitivanje broja i morfoloških karakteristika ganglijskih i satelitskih ćelija i način njihovog grupisanja u GVSG korišćenjem histohemijskih metoda bojenja. Finalni ciljevi bili su i analiza broja i morfoloških karakteristike ćelija koje pokazuju imunoreaktivnost na neuropeptide: NPY, VIP, SP, SOM i CGRP, u gornjoj i donjoj polovini gangliona.

U poglavlju **materijali i metode** opisano je dobijanje uzoraka GVSG, ukupno 20 izdvojenih humanih gangliona sa Instituta za sudsku medicinu i Instituta za anatomiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mikrodisekcija krvnih sudova i samog gangliona obavljena je u Laboratoriji za vaskularnu anatomiju Instituta za anatomiju, histohemijska bojenja vršena su na Institutu za histologiju i embriologiju, imunohistohemijska istraživanja su obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju i Beo-lab Laboratoriji za imunohistohemiju u Beogradu. Svi preparati su analizirani pod Leica DM mikroskopom, snimljeni su Leica digitalnom kamerom, a za morfometrijsku analizu korišćen je softver Leica Interactive Measurements. Naučne analize su obavljene u skladu sa principima Helsinške deklaracije, gde su izneti medicinsko pravni i etički aspekti medicinskih istraživanja na ljudima. Etička komisija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu dala je saglasnost za izradu doktorske teze.

Poglavlje **rezultati istraživanja** sadrži precizne vrednosti svih merenja obavljenih na ganglionima, njihovim sudovima i ćelijama, kao i 93 digitalne fotografije i 25 pratećih tabela.

Poglavlje **diskusija** je napisano jasno i koncizno, svi rezultati su poređeni sa u dostupnoj literaturi navedenim sličnim vrednostima drugih istraživača.

U poglavlju **zaključci** izvedeni su finalni zaključci dobijeni iz prikazanih rezultata istraživanja i zatim poređeni sa već postojećim nalazima, koji su potpuno odgovorili na formirane ciljeve istraživanja.

Poglavlje **literatura** sadrži listu od 66 savremenih i aktuelnih referenci koje su značajno uticale na pripremanje, izvođenje i tumačenje rezultata samog istraživanja.

## **B. Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu izveštaja dobijenog korišćenjem programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije pod nazivom „Analiza mikromorfoloških i imunohistohemijskih karakteristika gornjeg vratnog simpatičkog gangliona čoveka“, kandidata dr Jelene Boljanović, 21.03.2024. godine, utvrđeno je da je procenat podudarnosti

teksta (similarity index) iznosio 11%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je bibliografskih podataka o korišćenju literaturi, tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu. Ovaj izveštaj ukazuje na originalnost završene doktorske disertacije.

### **C. Kratak opis postignutih rezultata**

Prvi deo doktorske disertacije sadrži morfološke analize kojim su izdvojena dva oblika GVSG: valjkasto ovalni u 60% slučajeva i pljosnato cilindrični u 40% gangliona. Ovalni GVSG su prosečno kraći u odnosu na duže cilindrične ganglione. Prosečna površina ovalnih GVSG je statistički značajno manja od prosečne površine cilindričnih gangliona. Ushodna ždrelna arterija (a. *pharyngea ascendens*, APhA) je postojala na svim preparatima i od nje se odvajalo 2 do 4 grane, prosečnog kalibra 0,32 mm namenjene vaskularizaciji strome gangliona. Nisu uočeni anastomotični sudovi koji su učestvovali u formiranju spoljašnjih međuarterijskih anastomoza.

Drugi deo teze posvećen je analizi intraganglijske vaskularizacije GVSG. Posle imunske reakcije na vaskularni endotelni marker CD34 intraganglijska arterijska vaskularna mreža je bila predmet analize računanjem gustine mikrosudova (GMS) u gornjem i donjem delu GVSG. Distribucija mikrosudova u gornjem i donjem delu GVSG bila je uniformna, bez pokazanih mikromorfoloških razlika i statistički značajne razlike u broju mikrosudova. Takođe, gustina mastocita (GMA) određivana je u dva dela GVSG, u gornjem i donjem delu gangliona. Raspored mastocita u gornjem i donjem delu GVSG bio je uniforman, bez pokazanih razlika u rasporedu i bez statistički značajne razlike GMA između dva dela gangliona.

Rezultati trećeg dela disertacije odnose se na određivanje mernih karakteristika ganglijskih i satelitskih ćelija GVSG. Statistička analiza je pokazala da nije bilo značajne razlike u distribuciji neurona u gornjim i donjim delovima gangliona. Poređenjem prosečnih prečnika i površina 195 neurona gornjih delova GVSG sa prosečnim dijametrima 198 neurona donjih delova gangliona nisu nađene statistički značajne razlike u ovim delovima gangliona. Mikromorfometrijska analiza veličina ganglijskih neurona omogućila je, u okviru podele na male, srednje i velike neurone, da se pokaže da su mali neuroni bili dominantna populacija u GVSG, 85,1% u gornjim delovima i 81,8% prisutnih ćelija u donjim delovima gangliona. Velikih ganglijskih ćelija nije bilo na preparatima. Određivanje broja ganglijskih ćelija kao i gustine mikrosudova (GMS) poslužilo je da se ustanovi prosečan odnos neuroni/mikrosudovi koji je za gornji deo gangliona iznosio 1:4,26, a za donji deo gangliona 1:4,18. Glijalne satelitske ćelije (GSC) su bile prisutne na svim ganglijskim neuronima i njihov broj je na presecima gangliona iznosio od 3 do 7, prosečno 4,39 po neuronu.

U četvrtom, najobimnijem delu teze istraživana je imunoreaktivnost ćelija u GVSG na neuropeptid Y (NPY). Brojanjem je utvrđeno da slučajno izabrana mikroskopska polja gangliona sadrže 24,3% NPY+ neurona u svom gornjem delu, dok je u donjem delu bilo 32% NPY+ neurona. Obavljeno je i određivanje mernih karakteristika imunoreaktivnih NPY+, kao i NPY- ganglijskih nervnih ćelija (GNČ). Neuroni su najvećim delom bili male veličine,

78,3%, dok je ćelija srednje veličine bilo 21,7%. Vrlo slično su se raspoređivali i NPY-neuroni, opisano je 67,9% malih neurona i 32,1% neurona srednje veličine. U gornjim delovima GVSG prosečna površina NPY- ( $634,34 \mu\text{m}^2$ ) ćelija je bila statistički značajno veća od površine NPY+ ( $485,42 \mu\text{m}^2$ ) ćelija. U donjim delovima GVSG poređenjem prosečnih površina NPY+ ( $340,67 \mu\text{m}^2$ ) i NPY- ( $500,19 \mu\text{m}^2$ ) neurona bila je očigledna statistička značajnost razlike površina ćelija, odnosno prosečna površina NPY- ćelija je bila značajno veća od površine NPY+ ćelija. Takođe, poređenje mernih karakteristika NPY+ i NPY-ganglijskih nervnih ćelija gornjih sa donjim delovima gangliona obuhvatilo je prosečne površine i prosečne prečnike ćelija. Statistička analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika između prosečnih površina NPY+ ( $485,42 \mu\text{m}^2$ ) ćelija u gornjim delovima gangliona i NPY+ ( $340,67 \mu\text{m}^2$ ) neurona u donjim delovima gangliona. Takođe, poređenje prosečnih površina NPY- ( $634,34 \mu\text{m}^2$ ) ćelija u gornjim delovima gangliona i NPY- ( $549,24 \mu\text{m}^2$ ) neurona u donjim delovima gangliona pokazalo je statističku značajnost razlike prosečnih površina ćelija. Utvrđeno je da mikroskopska polja gornjeg dela gangliona sadrže 16,6% VIP+ neurona, dok je u donjem delu bilo 16,4% VIP+ neurona. VIP+ neuroni su najvećim delom bili male veličine, 67,5%, dok je ćelija srednje veličine bilo 32,5%. Poređenjem prosečnih površina VIP+ ( $579,81 \mu\text{m}^2$ ) ćelija gornjih delova i VIP+ ( $671,27 \mu\text{m}^2$ ) neurona donjih delova gangliona nije nađena statistički značajna razlika između merenih površina ćelija. Ganglijske nervne ćelije GVSG nisu pokazale SP imunoreaktivnost, osim nekih SP+ nervnih vlakana. Nađeno je da mikroskopska polja gornjeg dela gangliona sadrže 13,28% SOM+ neurona, dok je u donjem delu bilo 14,29% SOM+ neurona. SOM+ neuroni su najvećim delom bili male veličine, 61,8%, dok je ćelija srednje veličine bilo 38,2%. Poređenjem prosečnih površina SOM+ ( $693,74 \mu\text{m}^2$ ) ćelija gornjih delova i SOM+ ( $608,86 \mu\text{m}^2$ ) neurona donjih delova gangliona nije nađena statistički značajna razlika između merenih površina ćelija. Pokazano je da mikroskopska polja gornjeg dela gangliona sadrže 12,17% CGRP+ neurona, dok je u donjem delu bilo 13,51% CGRP+ neurona. CGRP+ neuroni su najvećim delom bili male veličine, 75,6%, dok je ćelija srednje veličine bilo 24,4%. Poređenjem prosečnih površina CGRP+ ( $647,86 \mu\text{m}^2$ ) ćelija gornjih delova i CGRP+ ( $579,76 \mu\text{m}^2$ ) neurona donjih delova gangliona nije nađena statistički značajna razlika između merenih površina ćelija.

#### **D. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Podaci o uobičajenom anatomskom položaju GVSG su u saglasnosti sa tradicionalnim opisima morfoloških i topografskih karakteristika gangliona (Fazliogullari i sar., 2016; Loke i sar., 2016; Standring i sar., 2021). Gornji vratni simpatički ganglion je najveći od svih simpatičkih gangliona, dužine 10-30 mm, širine 5-8 mm, često sa suženjem u sredini. Grupa autora navodi da je GVSG prosečnih dimenzija 15,18 mm, dužine, a 4,62 mm širine (Fazliogullari i sar., 2016). Rezultati drugih autora imaju veće vrednosti, prosečna dužina gangliona bila je 33 mm, a širina 8,1 mm (Saylam i sar., 2009). Navedena merenja prečnika i površine gangliona pokazala su da su ovalni GVSG prosečne dužine od 18,96 mm kraći u odnosu na duže cilindrične ganglione čije su prosečne vrednosti bile 20,79 mm. Takođe, ovalni GVSG su neznatno prosečno užji, širine od 6,83 mm, u odnosu na šire cilindrične ganglione, 7,09 mm. Takođe, prosečna površina ovalnih GVSG, koja je iznosila 97155,09

mm<sup>2</sup> je statistički značajno manja od prosečne površine cilindričnih gangliona koja je bila 129106,34 mm<sup>2</sup>. Ovaj rezultat može da se objasni dodatnim podatkom da su ovalni ganglioni zbog svog valjkastog izgleda i deblji nego pljosnati cilindrični ganglioni koji su tanji. Korišćenje naprednih radioloških tehnika za identifikaciju GVSG kod karcinoma glave i vrata može da dovede do zabune da se identifikuje udvojeni ganglion, a da disekcija i histološka analiza pokažu da se radi o retrofaringealnom limfnom nodusu u blizini stvarnog GVSG (Yakota i sar., 2018; Mansour i Kulesza, 2021).

Podaci u dostupnoj literaturi koji opisuju morfološke i topografske karakteristike vaskularizacije GVSG su retki, nekompletni i zapostavljaju sam ganglion na račun opisa vaskularizacije simpatičkog stabla (Tubbs i sar., 2002). Okvirno, istraživači su saglasni da GVSG dobija arterijsku vaskularizaciju od grana ushodne ždrelne arterije, *a. pharyngeae ascendens* (APhA), bočne grane spoljašnje karotidne arterije, *a. carotis externa* (Calvacanti i sar., 2009). Rezultati koji se odnose na položaj i topografske odnose GVSG, kao i na poreklo krvnih sudova su u potpunosti u saglasnosti sa navodima u tradicionalnoj anatomske literaturi (Fazliogullari i sar., 2016; Standring i sar., 2021). Intraganglijska vaskularna mreža svojim kapilarima, prema navodima grupe autora, na nivou nervnih ćelija formira tzv. mikrocirkulatorni krevetac "*microcirculatory bed*". Izuvijani kapilari oblikuju prostorne petlje i omče oko tela ganglijskih ćelija (Smoliar i sar., 1998). Tako je mreža kapilara korpasto postavljena preko sloja satelitskih glijalnih ćelija koje u potpunosti prekrivaju some neurona. Na taj način se formira jedinstvena "krv-nervno tkivo barijera perifernog nervnog sistema" koja odgovara krvno-moždanoj barijeri centralnog nervnog sistema (Ćetković i sar., 2020; Hanani i Spray, 2020; Milosavljević i sar., 2021). Dobijeni podaci o gustini mikrosudova u humanom GVSG su prvi po mišljenju autora analizirajući dostupnu literaturu, za razliku od vrlo malo postojećih analiza intraganglijske vaskularizacije trigeminalnog i genikulatnog gangliona (Smoliar i sar., 1998; Dožić i sar., 2014; Ćetković i sar., 2020; Mirčić i sar., 2021). Poredeći ove vrednosti sa prosečnom gustinom mikrosudova (GMS) trigeminalnog gangliona pokazano je da je GMS u trigeminalnom ganglionu veća, iznosila je 192,86, što verovatno ukazuje na bolju prokrvljenost i veće metaboličke zahteve senzornih ganglijskih ćelija u odnosu na simpatičke ćelije u GVSG (Mirčić i sar., 2021). Značaj ovih nalaza je činjenica da je ravnomeran raspored intraganglijskih krvnih sudova od velike važnosti za normalno i stabilno funkcionisanje neurona kao i glijalnih satelitskih ćelija (GSC). Postojanje nepravilnosti u rasporedu mikrosudova u samom ganglionu može najpre da dovede do promena u funkcionisanju GSC. Aktivacija GSC, zbog karakterističnog položaja preko površine ganglijskih nervnih ćelija (GNC) sa pukotinastim razmakom od samo 20 nm, kao i usled stalne komunikacije sa multipolarnim neuronima i sinapsama na njihovoj površini, može da dovede i do disfunkcije GNC. Posledica ovakvih poremećaja je svakako gubitak kontrole GSC nad sinaptičkom transmisijom GNC, odnosno dolazi do povećane osetljivosti neurona i njihove preterane aktivnosti, čiji je rezultat bolno stanje (Hanani i Spray, 2020).

Rezultati proučavanja mehanizma razvoja različitih tipova glavobolja ukazuju da mastociti imaju važnu ulogu za njihov nastanak. Mastociti su prisutni u periganglijskom vezivnom tkivu ali i u blizini GSC i GNC u samom GVSG. Podataka u dostupnoj literaturi koji se odnose na mikromorfološke karakteristike mastocita u GVSG nema što može da bude dobar povod za buduća istraživanja. Oštećenje GNC i ekscitacija GSC uzrokuje oslobađanje ATP što

može da dovede do degranulacije mastocita i oslobađanje vazoaktivnih supstanci: histamina, serotonina, citokina i dr., koji doprinose aktivaciji simpatičkih neurona i vlakana i napadu glavobolje (Koroleva i sar., 2019). Podaci ove studije dobijeni imunohistohemijskim označavanjem intraganglijskih mastocita govore o njihovoj uniformnoj raspodeli unutar ganglijskog tkiva. Poređenjem gustine mastocita (GMA) u gornjem i donjem delu GVSG pokazano je da je njihov broj iznosio 4,5 odnosno 4,7 i da nije bilo statistički značajne razlike u njihovoj distribuciji. Ovaj nalaz je potvrdio da su mastociti uniformno raspoređeni intraganglijski u blizini krvnih sudova, ali i između ganglijskih ćelija, takođe i u periganglijskom vezivnom tkivu, kao i između aksona simpatičkih nerava, grana koje izlaze iz ganglionu. Mogu da se porede ovi rezultati sa nalazima grupe autora o gustini mastocita u trigeminalnom ganglionu koja je bila značajno niža, GMA je iznosila 1,35 (Mirčić i sar., 2021). To govori da tokom odgovora na fiziološki stres i oslobađanja hormona stresa postoji mogućnost da je aktivacija mastocita važna za stimulaciju simpatičkih ganglijskih neurona u GVSG (van der Kleij i Bienenstock, 2005). Mastociti, kao ćelije uključene u imunske reakcije organizma, su prisutni u blizini krvnih sudova i nervnih završetaka u svim delovima tela, pa i u senzornim, parasimpatičkim i simpatičkim ganglionima. Oštećenje ganglijskih neurona (tokom infekcija, alergijskih i inflamatornih stanja ili povreda) i aktivacija satelitskih ćelija deluje na aktivaciju i degranulaciju mastocita u ganglionima i do oslobađanja supstanci (serotonin, histamin, citokini ...) koje stimulišu nervna vlakna kako u duri kod trigeminalnog ganglionu i izazivanja napada migrene, tako i vazomotornih simpatičkih vlakana, što deluje na razvoj bolnih sindroma uzrokovanih vazokonstrikcijom (Koyuncu Irmak i sar., 2019; Koroleva i sar., 2019; Hanani i Spray, 2020; Cho i sar., 2023).

Neuroni humanog GVSG, različite veličine i broja, sadrže različite neuropeptide: neuropeptid Y (NPY), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), somatostatin (SOM) i peptid povezan sa kalcitoninskim genom (calcitonin gene-related peptide - CGRP) itd. (Baffi i sar., 1992; Miyauchi i sar., 2001). NPY aktivira kalijumske kanale, inhibira kalcijumske kanale i inhibira glutamatske receptore i oslobađanje glutamata (Zhang i sar., 2021). NPY pozitivni vazokonstriktorni neuroni inervišu krvne sudove glave i imaju vazomotornu funkciju i inervišu dužicu i epifizu. Takođe učestvuju u regulaciji krvnog pritiska i srčanog ritma, dok vazokonstrikcijom krvnih sudova žlezda indirektno regulišu sekreciju pljuvačke (Zhang i sar., 2021). NPY ima neuroprotektivnu ulogu koju ostvaruje kroz smanjenje inflamacije nervnog sistema, povećanja količine mikronutrijenata, stimulaciju procesa autofagije, smanjenje oksidativnog stresa. Potom ulogu u stimulaciji angiogeneze i integriteta structure nerava (Zhang i sar., 2021). Istraživanja su pokazala da NPY pozitivni neuroni imaju vazomotorno dejstvo i inervišu krvne sudove, pre svega u lobanji. NPY negativni neuroni imaju sekretomotorno dejstvo i inervišu pljuvačne žlezde (Chiba i Tanaka, 1998). Studije retrogradnog obeležavanja GNC u gornjem vratnom ganglionu čoveka posebnim trejserima i korišćenjem metoda imunofluorescencije donose podatke da ekspresiju NPY u gornjem vratnom ganglionu pokazuje 59,1% neurona (Kokubun i sar., 2019). Druga grupa istraživača navodi da je procenat NPY+ neurona u GVSG kod sisara između 50 i 65% i da su to vazomotorni neuroni koji inervišu kranijalne sudove (Headley i sar., 2005). Navode se i podaci da je kod miša opisano 40% NPY+ neurona u GVSG (Masliukov i sar., 2012). NPY je snažan vazokonstriktor, aktivna je supstanca neurona gornjeg vratnog simpatičkog ganglionu koja učestvuje u regulaciji aktivnosti vratnog dela jednjaka. NPY postoji u oko 30% neurona koji inervišu jednjak (Rytel i sar. 2019). Prikazani rezultati ove studije pokazuju da je bilo 24,3% NPY+ neurona u gornjem delu GVSG, dok je u donjem delu bilo 32% NPY+ neurona. Objedinjeni rezultati za ceo ganglion prikazuju da je

28,4% ćelija pokazivalo NPY+ imunoreaktivnost, što je manje nego u gornjim navedenim nalazima a približno nalazu poslednje grupe istraživača. Razlog je verovatno što autor teze u ovim istraživanjima nije primenio metodu fluorescentne imunohistohemije koja je preciznija od klasične imunohistohemijske analize. Analiza i poređenje NPY imunoreaktivnosti u GVSG pacova pokazalo je da su NPY pozitivne ganglijske nervne ćelije manje površine some od NPY negativnih neurona i postavljene su u distalnom delu gangliona, u blizini mesta izlaska *n. caroticus externus*-a (Headley i sar., 2005). Sa druge strane kako je već rečeno nije potvrđena bilo kakva razlika u morfometrijskim karakteristikama neurona gornjih i donjih delova GVSG. Ova detaljna ispitivanja preparata imunohistohemijski bojenih na detekciju NPY antigena na ganglijskim ćelijama bila su sprovedena sa ciljem da se utvrdi veza između položaja neurona u GVSG, njihove veličine i imunoreaktivnosti. U ovim analizama važan je nalaz grupe autora da je ustanovljena relativno precizna topografska distribucija neurona u odnosu na rostro kaudalnu osovinu GVSG. Gornji deo glave sa krvnim sudovima mozga, pinealna žlezda, čelo i oči su inervisani aksonima poreklom iz gornjeg (rostralnog) dela GVSG, dok usta sa pljuvačnim žlezdama i strukture vrata dobijaju simpatičku inervaciju iz donjeg (kaudalnog) dela gangliona (Flett i Bell, 1991). Ova istraživanja su poredila merne podatke ganglijskih ćelija različite imunoreaktivnosti, NPY+ i NPY-, unutar gornjeg i donjeg dela GVSG, kao i neurone gornjeg dela sa neuronima donjeg dela gangliona. U autoru dostupnoj literaturi retki su podaci koji se odnose na merne karakteristike neurona u GVSG, a gotovo da ih nema urađenih na humanom materijalu, što daje posebnu težinu proučavanjima ali i veliku odgovornost da se u naučnu javnost po prvi put iznose takvi rezultati. Headley i sar., (2005) u svom opširnom prikazu eksperimentalno na pacovima pokazuju da položaj neurona u GVSG, duž rostro kaudalne osovine, može da bude od značaja za područje inervacije neurona ali njihove morfometrijske karakteristike i imunoreaktivnost (Flett i Bell, 1991). Ćelije gornjih delova gangliona namenjene su inervaciji krvnih sudova mozga, očne duplje i kože gornjeg dela glave, odnosno to su NPY pozitivni neuroni sa vazokonstrikcijom kao rezultatom stimulacije. Ćelije donjih delova gangliona inervišu krvne sudove usta, lica i zadnjeg dela glave, kao i pljuvačne žlezde. Vazomotorni neuroni su NPY pozitivni, a sekretomorni neuroni su NPY negativni (Headley i sar., 2005; Kokubun i sar., 2019). Rezultat grupe autora da su prosečno NPY+ neuroni 4 µm manjeg prečnika od NPY- neurona možemo da poredimo sa nalazima ove teze. Takođe, ovi autori navode da rostralno-kaudalno posmatrano razlike prečnika NPY- i NPY+ neurona su u gornjem delu manje, oko 1 µm, dok su donjem delu razlike veće, prosečno 6 µm (Headley i sar., 2005). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju navedene nalaze, naime NPY+ neuroni gornjeg dela gangliona, prosečnog prečnika RM=24,35 µm, su 2,74 µm manjeg prečnika od NPY- neurona gornjeg dela gangliona, prosečno prečnika RM=27,09 µm. Donji deo gangliona je pokazivao nešto drugačiju razliku ekspresije NPY. Naime, NPY+ neuroni donjeg dela gangliona, prosečnog prečnika RM=20,02 µm, su 5,36 µm manjeg prečnika od NPY- neurona donjeg dela gangliona, prosečnog prečnika RM=25,38 µm. Razlike prosečnih prečnika NPY- i NPY+ neurona u gornjim i donjim delovima GVSG su statistički značajne. Razlog ove distribucije veličina ganglijskih ćelija po navodima citiranih autora je u povećanju veličine distalnih NPY-neurona u odnosu na proksimalne NPY- neurone za 4,4 µm. Prema nalazima u ovoj tezi distalni NPY negativni neuroni prosečne veličine 25,38 µm, u odnosu na proksimalne NPY negativne neurone prosečne veličine 27,09 µm, su za 1,71µm manjeg prosečnog prečnika. Poređenjem izmerenih navedenih prosečnih prečnika NPY- i NPY+ neurona u gornjim i donjim delovima GVSG zaključeno je da je uzrok smanjenja razlike u prosečnim prečnicima u gornjim i donjim delovima gangliona, zapravo smanjenje prosečnog prečnika NPY+ neurona za 4,33 µm, od 24,35 µm u gornjim

delovima, na 20,02  $\mu\text{m}$  u donjim delovima gangliona. Veličina smanjenja prosečnog prečnika NPY+ neurona za 4,33  $\mu\text{m}$  odgovara u potpunosti opisanom povećanju prosečnog prečnika NPY- neurona za 4,4  $\mu\text{m}$ , vrednost je ista ali tip ćelija koji trpi promene je drugi od opisanog. Funkcionalan razlog za značajno smanjenje veličine vazokonstriktorskih NPY+ vazomotornih neurona u donjem delu gangliona je verovatno smanjeno područje vaskularne inervacije u predelu lica i potiljka u odnosu na vaskularizaciju intrakranijalnih i intraorbitalnih struktura, koje dobijaju inervaciju od simpatičkih ćelija u gornjem delu gangliona. Sa druge strane razlog malog smanjenja veličine sekretomotornih NPY- ćelija u donjem delu gangliona su velike i male pljuvačne žlezde usne duplje koje dobijaju inervaciju od njih, nasuprot značajnoj sekretomotornoj inervaciji suzne i parotidne pljuvačne žlezde čiji krvni sudovi su inervisani aksonima iz gornjeg dela gangliona (Arciszewski i Wasowicz, 2006). Rezultati su pokazali da je prosečna površina NPY+ neurona u gornjim delovima gangliona bila statistički značajno manja od prosečnih površina SOM+ i CGRP+ neurona. Takođe, u donjim delovima gangliona prosečna površina NPY+ neurona bila je statistički značajno manja od prosečnih površina VIP+, SOM+ i CGRP+ neurona.

## **E. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo disertacije**

**Boljanović J, Milisavljević M, Latas M, Puškaš L, Bogosavljević N, Vujačić M, Aleksandrić D, Četković D, Branković N, Dožić A, Četković M.** Arterial supply and morphological characteristics of sympathetic neurons in the human superior cervical ganglion. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2024;18:1372180. doi: 10.3389/fnana.2024.1372180. **M21a IF 2,9.**

**Boljanović J, Latas M, Milisavljević M.** Sympathetic superior cervical ganglion, glial satellite and ganglionic nerve cells. *Medicinski podmladak*. 2024; 76(1). doi: 10.5937/mp76-48303. **M52.**

## **F. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)**

Doktorska disertacija pod nazivom „Analiza mikromorfoloških i imunohistohemijskih karakteristika gornjeg vratnog simpatičkog gangliona čoveka“, kandidata dr Jelene Boljanović, predstavlja originalan naučni doprinos u objašnjavanju mikromorfoloških karakteristika periganglijske i intraganglijske arterijske vaskularizacije humanog GVSG. Ispitivanjem broja i morfoloških karakteristika ganglijskih, satelitskih ćelija i mastocita i načina njihovog grupisanja u gornjim i donjim delovima GVSG izvedeni su zaključci da je njihova distribucija u ganglionu uniformna, bez pokazanih razlika u rasporedu. Rezultati istraživanja su pokazali da su ganglijski neuroni koji pokazuju imunohistohemijsku reaktivnost na NPY, kao i NPY negativne ćelije značajno manje veličine u donjim delovima GVSG, u odnosu na neurone gornjih delova gangliona. Za ovu morfološku različitost ponuđeno je i funkcionalno obrazloženje. Rezultati ove teze su pokazali da su NPY+ vazomotorni ganglijski neuroni značajno veći u gornjem delu GVSG šaljući aksone ka krvnim sudovima mozga, kao i NPY- sekretomotorni neuroni namenjeni inervaciji parotidne i suzne žlezde. Analiza broja i morfoloških karakteristika ćelija koje pokazuju VIP, SP, SOM i CGRP imunoreaktivnost, u gornjoj i donjoj polovini gangliona, pokazala je ne postojanje statistički značajnih razlika merenih parametara.



Ceneći dosadašnji naučni rad kandidata, na osnovu kvaliteta napisane disertacije koja prema svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim ciljevima istraživanja, dobro osmišljenoj savremenoj metodologiji, precizno i pregledno iznetim rezultatima rada sa brojnim originalnim fotografijama, razložnoj sistematičnoj diskusiji i dobro formulisanim odgovarajućim zaključcima, ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog istraživanja, ova komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da usvoji pozitivan izveštaj o doktorskoj disertaciji dr Jelene Boljanović i odobri njenu javnu odbranu.

u Beogradu, 15. aprila 2024. godine

**Mentor:**

---

Prof. dr Milan Milisavljević

**Komentor:**

---

Prof. dr Milan Latas

**Članovi Komisije:**

---

Doc. dr Ana Starčević

---

Doc. dr Darko Laketić

---

Doc. dr Milica Velimirović  
Bogosavljević

---

Doc. dr Aleksandra Dožić

---

Prof. dr Zdravko Vitošević