

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

Dr Aleksandra M. Doži

**ANALIZA MIKROANATOMSKIH,  
HISTOLOŠKIH I IMUNOHISTOHEMIJSKIH  
KARAKTERISTIKA GANGLIONA  
GENICULI FACIJALNOG ŽIVCA OVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

Dr Aleksandra M. Doži

**ANALYSIS OF MICROANATOMICAL,  
HISTOLOGICAL AND  
IMMUNOHISTOCHEMICAL  
CHARACTERISTICS OF GENICULATE  
GANGLION OF HUMAN FACIAL NERVE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor: Doc. dr Mila Petković-Milisaavljević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

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

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

Prof. dr Jasna Janićić, predsednik, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Aleksandar Maliković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dinka Mucić, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doktorska teza je realizovana na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i nastala je kao rezultat ostvarivanja istraživačkih ciljeva projekata koje u okviru Osnovnih istraživanja finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, za istraživački period 2010-2016. godine.

Ovom prilikom se najsrdačnije zahvaljujem prof. dr Veri Todorović na poverenju, izuzetnoj požrtvovanosti i uložnim naporima tokom izrade teze.

Svojoj mentorki, doc. dr Milici Stanković -Milisavljević, zahvaljujem se na toleranciji, neophodnoj podršci i stručnoj pomoći u svim fazama izrade ove doktorske teze.

Želela bih da se zahvalim svom komentoru, prof. dr Vasi Antunoviću, na korisnim savetima i nesebičnoj pomoći u toku uobližavanja ovog rada.

Profesoru dr Milanu Milisavljeviću, kolegi anatomu, dugujem zahvalnost za pomoć u izvođenju mikromorfoloških istraživanja i tehničkoj obradi podataka.

Profesoru dr Slobodanu Marinkoviću, zahvaljujem za pomoć da razumem probleme naučnog rada.

Kolektivu Instituta za anatomiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu zahvalna sam na razumevanju i stalnoj brizi da ne zastanem u najznačajnijim koracima na putu stručnog i naučnog usavršavanja.

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

## REZIME

Posebne mikromorfološke karakteristike vaskularizacije kolenog gangliona (*ganglion geniculi*), kao i mogu i klinički značaj periganglijske i intraganglijske vaskularne mreže bili su prvi ciljevi ove studije. Drugi cilj studije bio je da se prouči histologija i imunohistohemijske karakteristike ganglijskih neurona u ganglionu geniculi.

Krvni sudovi 14 slepoočnih kostiju odraslih osoba i genikulatnih gangliona, posle injiciranja mešavine tuša i želatina u arterijski sistem, mikrodisekovani su i proučavani pod stereomikroskopom. Dvadeset humanih genikulatnih gangliona poreklom od 20 osoba, dobijenih rutinskom obdukcijom, proučavani su posle histoloških bojenja metodama Klüver-Barrera, Weigert-Van Gieson, Bielschowsky, Gordon-Sweet, Masson i Picro-Mallory i posle imunohistohemijskih reakcija na neke od neuronskih markera, neuropeptida i neurotransmitera.

Genikulatni ganglion bio je vaskularizovan petroznom arterijom, *a. petrosa* (AP), obično jednom, osim u jednom slučaju kada ih je bilo dve. AP je uvek bila grana *a. meningeae mediae*, prosečno spoljašnjeg prenika 0,44 mm i prosečno unutrašnjeg prenika od 0,24 mm. AP je prosečno bila 17,1 mm duga. Prosečno se od nje odvajala 1,3 grana za vaskularizaciju *n. petrosus majora*, prosečno prenika 0,024 mm, kao i prosečno 1,6 grana namenjena periganglijskoj vaskularizaciji kolenog gangliona, prosečno prenika 0,029 mm. Mikroskopska polja preseka genikulatnog gangliona imala su prosečno 99,8 mikrosudova koji su okruživali 27,4 ganglijskih elija, tako da je neuron/sud odnos bio 1:3,6.

Na ukupno 20 genikulatnih gangliona, analizom njihovih preseka, utvrđeno je da je najveći broj gangliona trouglast, 14/20 (70%), zatim su sledili ovalni ganglioni, 5/20 (25%), dok je samo jedan ganglion (5%) bio sastavljen od grupica razbacanih ganglijskih elija u labirintnom delu facijalisa. Prosečna vrednost dužeg prenika gangliona iznosila je  $1187,957 \pm 31,98 \mu\text{m}$ , kraćeg prenika  $910,008 \pm 28,83 \mu\text{m}$ , prosečna površina preseka gangliona bila je  $648066,112 \pm 1126 \mu\text{m}^2$ , dok je prosečan obim iznosio  $4094,286 \pm 157,18 \mu\text{m}$ .

Ganglijske elije u ovoj studiji bile su pretežno elipsoidnog oblika. Prosečni dijametar elije iznosio je  $34,21 \pm 0,69 \mu\text{m}$ . Prosečni duži dijametar ganglijske elije bio je  $37,02 \pm 0,79$

$\mu\text{m}$ , kra i  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$ , a prose na površina ganglijskih elija iznosila je  $944,84 \pm 36,93 \mu\text{m}^2$ . Prose an broj satelitskih elija na preseku ganglionu bio je  $6,55 \pm 1,58$  (od 4-11).

Naša studija je pokazala klasi an nalaz što se ti e markiranja neurona sa pan-neuronskim markerima – neuron specifi nu enolaza (NSE), sinaptofizin (Sy), protein genski product 9.5 (PGP9,5) i S-100 protein (S-100), da se ovim markerima boji oko 85-90% nervnih elija.

Analiza ekspresije NF-H u ganglijskim elijama pokazala je da 91% elija ekspirira 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  $178 \pm 85,5$ . elije koje su izrazito ekspirirale NF-H imale su statisti ki zna ajno ve i dijametar, obim i površinu u odnosu na elije koje su umereno ekspirirale NF-H i u odnosu na elije koje su bile slabo IR.

Supstanca P bila je ekspirirana ak u 70% elija GG prisutnih na popre nom preseku ganglionu, dok 30% elija nije ekspiriralo ovaj neuropeptid. Ukupan prora unati skor IR za supstancu P, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog ganglionu, iznosio je  $91,5 \pm 56,41$ . Statisti ka analiza je pokazala da su ganglijske elije koje ekspiriraju SP, u proseku zna ajno manje po dijametru, obimu i površini u odnosu na ganglijske elije koje ne ekspiriraju SP.

CGRP se ekspirirao u 62% elija GG, dok 38% elija nije ekspiriralo ovaj neuropeptid. Ukupan prora unati skor IR za CGRP, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog ganglionu, iznosio je  $81,62 \pm 40,45$ . Statisti ka analiza je pokazala da izme u CGRP+ i CGPR- elija nema razlike u njihovoj površini.

Statisti ka obrada rezultata pokazala je da su CGRP+ elije statisti ki zna ajno ve e od SP+ elija u pogledu dijametra, obima i površine.

Prou avane karakteristike vaskularizacije genikulatnog ganglionu mogu da budu korisna osnova u dekompressionoj neurovaskularnoj hirurgiji. S druge strane, histološke i imunohistohemijske osobine gustativnih i senzornih neurona u ganglionu od krucijalnog su zna aja za fundamentalnu nauku. Ova studija pruža osnovu za dalja prou avanja genikulatnog ganglionu sa nau nog i klini kog aspekta.

**Klju ne re i:** facijalni nerv; geniculatni ganglion; petrozna arterija; ganglijska elija; satelitska elija; imunohistohemija

**Nau na oblast:** Medicina, neuroanatomija

**ANALYSIS OF MICROANATOMICAL, HISTOLOGICAL AND  
IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF GENICULATE  
GANGLION OF HUMAN FACIAL NERVE**

**ABSTRACT**

Specific micromorphological characteristics of the geniculate ganglion blood supply, as well as the possible clinical significance of the extraganglionic and intraganglionic vessels were the first reasons for this study. The second aim of this study was to examine the histology and the immunohistochemical features of ganglion cells in the geniculate ganglion.

The vasculature of 14 adult temporal bones and geniculate ganglions were microdissected and examined under the stereoscopic microscope, after injecting their arteries with a mixture of India ink and gelatin. Twenty human geniculate ganglions of twenty persons, obtained during routine autopsy, were examined following Klüver-Barrera, Weigert-Van Gieson, Bielschowsky, Gordon-Sweet, Masson and Picro-Mallory histological stainings, and immunohistochemical reactions against certain neuronal markers, neuropeptides and neurotransmitters.

The geniculate ganglion was supplied by the petrosal artery (PA), singular in all the specimens except in one. The PA originated from the middle meningeal artery, whose outer diameter averaged 0,44 mm, and the inner diameter 0,24 mm. The PA averaged 17,1 mm in length. It always gave off an average of 1,3 branch for the supply of greater petrosal nerve, with the mean diameter of 0,024 mm, and 1,6 branch for the periganglionic arterial network with the mean diameter of 0,029 mm. Microscopic fields of the geniculate ganglion slides contained an average of 99,8 microvessels surrounding 27,4 ganglion cells, so that the neuron/vessel ratio was 1:3,6.

A total number of 20 geniculate ganglions were investigated, which were triangular in shape, 14/20 (70%), oval, 5/20 (25%), and in one case (5%) composed of islands of groups of neurons. An average value of longer axis of the ganglion cells was  $1187,957 \pm 31,98 \mu\text{m}$ , of shorter axis  $910,008 \pm 28,83 \mu\text{m}$ , an average area value was  $648066,112 \pm 1126 \mu\text{m}^2$ , and average perimeter of  $4094,286 \pm 157,18 \mu\text{m}$ .

An average value of longer axis of the geniculate ganglion cells, ellipsoid in shape, was  $37,02 \pm 0,79 \mu\text{m}$ , of shorter axis  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$ , and an average area value was  $944,84 \pm 36,93 \mu\text{m}^2$ . According to the size of ganglion cells we counted large cells, diameter

from 41-50  $\mu\text{m}$ , in 16% of cases, medium size cells, diameter from 31-40  $\mu\text{m}$ , in 51%, and small cells, diameter 15-30  $\mu\text{m}$ , in 33% of cases. Each sectioned neuron was surrounded by 4 to 11 elongated satellite cells, mean  $6,55\pm 1,58$ .

The immune reaction was positive in 85-90% of the neurons studied for neuron-specific enolase (NSE), protein gene product 9.5 (PGP9.5), S-100 protein (S-100) and synaptophysin (Sy),

The immune reaction against neurofilament protein (NF-H) was positive in 91% ganglion cells, with equal distribution in three defined groups of expression: poor, middle and high. Total score of NF-H immunoreactivity was  $178\pm 85,5$ . Ganglion cells with high NF-H immunoreactivity were large in size, and the difference to the poor immunoreactive cells was statistically significant.

Total score of substance P (SP) immunoreactivity of geniculate ganglion cells, positive in 70% of cases, was  $91,5\pm 56,41$ . Statistical analysis confirmed that SP positive immunoreactive cells are significantly smaller than SP negative cells.

Total score of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity of geniculate ganglion cells, positive in 62% of cases, was  $81,62\pm 40,45$ . Statistical analysis confirmed that CGRP positive immunoreactive cells are not significantly different in size than CGRP negative cells.

We showed that CGRP immunoreactive ganglion cells are statistically significantly larger cells than SP+ cells.

The observed characteristics of the geniculate ganglion vasculature could be the useful base for decompressive neurovascular surgery. Secondly, the histological and the immunohistochemical features of the gustatory and sensory ganglion cells of the geniculate ganglion are of the crucial importance for the fundamental science. This study is the basis for further examination of the geniculate ganglion from both the scientific and clinical aspect.

**Keywords:** facial nerve; geniculate ganglion; petrosal artery; ganglion cell; satellite cell; immunohistochemistry

**Scientific field:** Medicine, Neuroanatomy



## S A D R Ź A J

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nervus facialis – od anatomije i funkcije, preko embriologije i patologije do klini kog zna aja</b>	
<b>1.2. Anatomija facijalnog živca – opšti pregled</b>	
<b>1.2.1. Topografija i funkcionalna priroda moždanih nukleusa <i>n. facialis</i> i njihova supranuklearna kontrola</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2. Tok facijalnog nerva</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3. Bo ne i završne grane <i>n. facialis</i></b>	<b>12</b>
<b>1.2.4. Komunikacija sa drugim kranijalnim nervima i nervnim spletovima</b>	<b>16</b>
<b>1.3. Funkcija <i>n. facialis</i> (funkcionalna kategorizacija nervnih vlakana sadržanih u njemu)</b>	<b>19</b>
<b>1.4. Embriologija facijalnog živca</b>	<b>21</b>
<b>1.4.1. Embrionalni razvoj facijalnog živca (opšta razmatranja)</b>	<b>21</b>
<b>1.4.2. Sticanje neurofizioloških karakteristika neurona genikulatnog ganglionu u toku embrionalnog razvoja i njihovo održavanje u postnatalnom životu</b>	<b>22</b>
<b>1.4.3. Faktori važni za rast i diferencijaciju neurona GG</b>	<b>27</b>
<b>1.5. Ganglioni povezani sa <i>n. facialisom</i></b>	<b>27</b>
<b>1.5.1. Koleni ganglion facijalnog živca (<i>ganglion geniculi</i>)</b>	<b>27</b>
<b>1.5.2. Submandibularni ganglion</b>	<b>31</b>
<b>1.5.3. <i>Ganglion pterygopalatinum</i></b>	<b>31</b>
<b>1.6. Vaskularizacija <i>n. facialis</i></b>	<b>31</b>
<b>1.7. Patologija i klini ki zna aj <i>ganglionu geniculi</i></b>	<b>31</b>
<b>1.8. Gustatorni sistem i molekularni mehanizmi prepoznavanja ukusa</b>	<b>33</b>
<b>1.8.1. Gustatorni korpuskuli – ulu ukusa</b>	<b>33</b>
<b>1.8.2. Receptori ula ukusa</b>	<b>35</b>
<b>1.8.3. Pljuva ka i ose aj ukusa</b>	<b>39</b>
<b>1.9. Neuropeptidi potencijalno važni za <i>ganglion geniculi</i></b>	<b>39</b>
<b>1.9.1. Supstanca P (SP)</b>	<b>40</b>
<b>1.9.2. Peptid kodiran genom za kalcitonin (CGRP)</b>	<b>46</b>
<b>1.10. Mastociti kao medijatori nocicepcije</b>	<b>52</b>

<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>54</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Uzorak</b>	<b>56</b>
<b>4.1.1. Uzorak za mikromorfološka i morfometrijska istraživanja vaskularizacije i proučavanje topografskih odnosa <i>ganglionae geniculae</i> sa okolnim strukturama</b>	<b>56</b>
<b>4.1.2. Uzorak za histološka, histohemijska i imunohistohemijska istraživanja</b>	<b>57</b>
<b>3.2. Ispitivanje vaskularizacije <i>ganglionae geniculae</i></b>	<b>57</b>
<b>3.3. Morfometrijska studija položaja <i>ganglionae geniculae</i></b>	<b>59</b>
<b>3.4. Priprema uzoraka za histohemijske i imunohistohemijske metode ispitivanja</b>	<b>60</b>
<b>3.5. Histohemijske metode ispitivanja</b>	<b>61</b>
<b>3.5.1. Trihromno bojenje po Massonu</b>	<b>61</b>
<b>3.5.2. Trihromno bojenje po Picro-Malloryju</b>	<b>62</b>
<b>3.5.3. Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna</b>	<b>62</b>
<b>3.5.4. Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastična vlakna i vezivo</b>	<b>63</b>
<b>3.5.5. Bojenje elastičnih vlakana sa orceinom</b>	<b>63</b>
<b>3.5.6. Bojenje po Bielschowskom za neurofibrile</b>	<b>63</b>
<b>3.5.7. Bojenje mijelina po Klüver-Barreri</b>	<b>63</b>
<b>3.6. Imunohistohemijske (IHH) metode ispitivanja</b>	<b>63</b>
<b>3.6.1. Dako LSAB+/HRP imunohistohemijska tehnika</b>	<b>64</b>
<b>3.6.2. EnVision+/Dual Link System/HRP</b>	<b>70</b>
<b>3.7. Morfometrijske metode ispitivanja <i>ganglionae geniculae</i></b>	<b>71</b>
<b>3.7.1. Merenje <i>ganglionae geniculae</i></b>	<b>71</b>
<b>3.7.2. Određivanje broja ganglijskih i satelitskih elija i merenje ganglijskih elija</b>	<b>72</b>
<b>3.7.3. Određivanje broja SP, CGRP i NF-H imunoreaktivnih ganglijskih elija i njihovih morfometrijskih karakteristika</b>	<b>73</b>
<b>3.7.4. Određivanje broja i merenje dimenzije krvnih sudova</b>	<b>73</b>
<b>3.8. Semikvantitativna procena veličine ekstracelularnog (interganglijskog) prostora kao i prostora koji zauzimaju ganglijske elije</b>	<b>73</b>
<b>3.9. Semikvantitativna procena ekspresije imunohistohemijskih markera i određivanje broja ganglijskih elija u <i>ganglionu geniculae</i> koje ekspimiraju SP, CGRP i NF-H</b>	<b>74</b>

3.10. Statisti ka obrada rezultata	74
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>75</b>
4.1. Mikroanatomske topografske karakteristije <i>ganglionu geniculi</i>	75
4.2. Vaskularizacija <i>ganglionu geniculi</i>	77
4.2.1. Periganglijski krvni sudovi	77
4.2.2. Intraganglijska vaskularna mreža	79
4.3. Morfološke karakteristike <i>ganglionu geniculi</i>	82
4.3.1. Položaj, izgled i veli ina ganglionu	82
4.3.2. Histološka organizacija <i>ganglionu geniculi</i>	83
4.3.3. Citološke karakteristike ganglijskih elija	86
4.3.4. Akcesorne ganglijske elije	91
4.4A. Ekspresija u <i>ganglionu geniculi</i> pan-neuronskih markera	96
4.4B. Ekspresija u <i>ganglionu geniculi</i> neurofilamentnog proteina velike molekulske težine (NF-H)	97
4.5. Ekspresija glavnih nociceptivnih peptida - SP i CGRP	102
4.5.1. Supstanca P	102
4.5.2. CGRP	109
4.5.3. Pore enje SP i CGRP - imunopozitivnih elija	113
4.6. Ekspresija drugih neuropeptida – VIP-a, NPY i somatostatina	116
4.7. Indirektna procena ekspresije u <i>ganglionu geniculi</i> neurotransmitera – aktivnost acetilholin-esteraze (AChE), tirozin-hidroksilaze i glutation-sintetaze	117
4.8. Ekspresija parvalbumina u <i>ganglionu geniculi</i>	118
4.9. Ekspresija Nurra-1 u ganglijskim elijama <i>ganglionu geniculi</i>	119
4.10. Mastociti u <i>ganglionu geniculi</i>	119
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>121</b>
<b>6. ZAKLJU CI</b>	<b>142</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>146</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Nervus facialis – od anatomije i funkcije, preko embriologije i patologije do kliničkog značaja

Koleni ganglion (*ganglion geniculi*, GG) leži u nivou prvog kolena (*geniculum*) facijalnog živca, tj. ispred njegovog temena. Piramidalnog je oblika i pre nika svega nekoliko milimetara. Ganglion ponekad zahvata i sam labirintni segment živca. U retkim slučajevima, ganglijske elije nalaze se pretežno u *meatusu acusticusu internusu*. Ganglion leži neposredno iznad baze *cochleae*, ispred *vestibuluma* i medijalno od *recessusa epithympanicusa*. Spomenuti topografski odnosi gangliona imaju veliki značaj u neurohirurgiji i operativnoj otologiji. Ganglion je, praktično, u kontaktu sa najvećim intrapetroznim ogrankom facijalisa, *n. petrosus majorom*, koji se upravo tu odvaja od facijalnog živca, a zatim napušta facijalni kanal prolazeći kroz *hiatus* i *sulcus n. petrosi majoris*. U blizini se nalazi i *n. petrosus minor*. Između gangliona i *cavuma tympani* ponekad ne postoji koštana pločica, te je on u kontaktu samo sa sluznicom bubne duplje. Može da izostane i koštana pločica iznad gangliona.

Što se tiče vaskularizacije facijalisa i *gangliona geniculi*, zapaženo je nekoliko izvora. Tako meatusni i labirintni segment *n. facialis* sa priključenim *n. intermediusom*, snabdevaju granice *a. cerebelli inferior anterior*. Timpanični segment i sam genikulatni ganglion ishranjuju ogranci *r. petrosus* iz *a. meningae mediae*, a mastoidni segment dobija ogranke od *a. stylomastoideae*. Zbog velikog kliničkog značaja vaskularizacije facijalnog živca i gangliona, savremena radiologija omogućila je merenje protoka kroz spomenute sudove primenom laserskog dopler-floumetra.

Ganglijske elije u *ganglionu geniculi* slične su drugim senzornim ganglijskim neuronima, kao što su oni u *ganglionu trigeminusa* i dorzalnim ganglionima spinalnih živaca. Međutim, nije dovoljno poznato koji se neuropeptidi/neurotransmiteri sintetisu u ovim neuronima, ni da li postoje citološke razlike između somatosenzornih i gustativnih neurona.

Polazeći od ovih činjenica, predmet ove doktorske disertacije bio je proučavanje mikroanatomske topografije *gangliona geniculi*, njegove vaskularizacije i imunohistohemijskih karakteristika, sa posebnim osvrtom na senzorne neuropeptide supstancu P i CGRP, kao i druge neispitane ili nedovoljno ispitane markere ganglijskih elija, kao što su pan-neuronski marker NeuN, transkripcioni faktor Nurr1 i parvalbumin. Takođe, u nedostatku literaturnih podataka o prisustvu mastocita u *ganglionu geniculi*, jedan segment doktorske disertacije bio je posvećen tom problemu.

## 1.2. Anatomija facijalnog živca – opšti pregled

Živac lica (*n. facialis*, VII par kranijalnih / moždanih nerava, VII CN) je mešoviti živac sa eferentnim (motornim i vegetativnim-parasimpatičkim) i aferentnim (senzitivnim i senzornim) nervnim vlaknima. Izlazi iz moždanog stabla, na granici *ponsa* i *medullae oblongatae* (*angulus pontocerebellaris*). Glavno, motorno jedno *n. facialis* (*nc. n. facialis s. nc. motorius n. facialis*) i njegovo parasimpatičko jedro (*nc. salivatorius superior*) smešteno je u ponsu, dok je visceralno senzitivno jedro (*nc. tractus solitarii s. nc. solitarius*) smešteno u *medulli oblongati*. Glavna funkcija ovog živca je inervacija mišića lica i sprovođenje osećaja ukusa sa prednje dve trećine jezika i usne duplje. Osim toga, daje i preganglijska parasimpatička vlakna za nekoliko ganglija glave i vrata (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013; Tubbs et al., 2013; Patel, 2015).

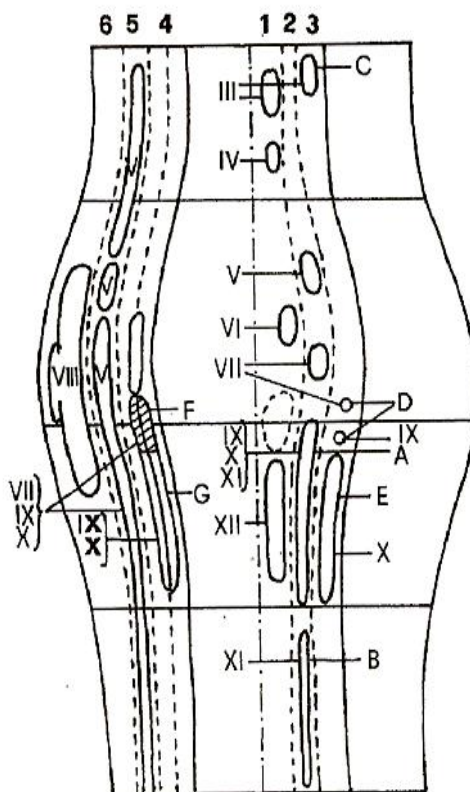
Ovaj živac je vrlo složene građe i potiče, kao što je već napomenuto, iz svojih jedara u moždanom stablu. Živac sadrži veliki motorni koren i manji senzitivni koren. Veliki motorni koren izgrađuje tzv. pravi facijalni živac i on je po svojoj prirodi isto motorni nerv, a manji senzorni koren gradi *n. intermedius* (*s. pars intermediae Wrisberg, s. n. glossopalatinus*) koji je dodatak ili “bis” sedmom kranijalnom nervu, a sadrži vegetativna (parasimpatička), senzorna i senzitivna nervna vlakna. Motorni i senzitivni koren nakon izlaska iz mozga prolaze kroz zadnju lobanjsku jamu (*fossa cranii posterior*), a napuštaju kranijalnu šupljinu kroz *meatus acusticus internus*. Nakon ulaska u facijalni kanal (*canalis facialis*) petroznog dela slepoočne kosti dolazi do fuzije korenova i formiranja facijalnog živca (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013; Tubbs et al., 2013; Patel, 2015).

U zavisnosti od anatomske prostiranja, razlikuje se nekoliko segmenata facijalnog živca: 1. cisternalni segment (u *cisterni pontocerebellaris*), 2. intrakanalikularni segment (u *meatusu acusticusu internusu*), 3. petrozni segment (*segmentum labyrinthicum, segmentum tympanicum* i *segmentum mastoideum*) i 4. segment koji prolazi kroz *foramen stylomastoideum* i parotidnu žlezdu. Od živca se odvajaju brojne grane, kako u piramidi temporalne kosti (intrapetrozne grane), tako i van nje (ekstrapetrozne grane). Prvoj grupi pripadaju *n. petrosus major*, *n. stapedius* i *chorda tympani*, a druga grupa obuhvata *n. auricularis posterior*, *r. digastricus*, *r. stylohyoideus* i *ramus cutaneus*. Osim toga, u samoj parotidnoj žlezdi facijalni živac se deli na dva stabla – *truncus (tr) temporofacialis* i *tr. cervicofacialis*. Od grana ovih stabala u žlezdi formira se *plexus facialis s. plexus intraparotideus*, a od njega završne grane facijalnog živca – *rr. temporales*, *rr. zygomatici*, *rr.*

*buccales*, *r. marginalis mandibulae* i *r. colli* (*s. cervicalis*), koje se završavaju u potkožnim miši ima lica i vrata (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013; Tubbs et al., 2013; Patel, 2015).

### 1.2.1. Topografija i funkcionalna priroda moždanih jedara *n. facialis* i njihova supranuklearna kontrola

Facijalni živac u moždanom stablu ima motorni nukleus – *nc. nervi facialis* i tri visceralna nukleusa – *nc. salivatorius superior*, *nc. lacrimalis* i *nc. solitarius*. Ova jedra, kao uostalom i sva jedra moždanih živaca imaju svoju preciznu topografsku lokalizaciju u okviru 6 funkcionalnih nizova jedara u moždanom stablu (slika 1.1) (Petanjek i Mili , 1997; Grey, 2000; Patel, 2015).



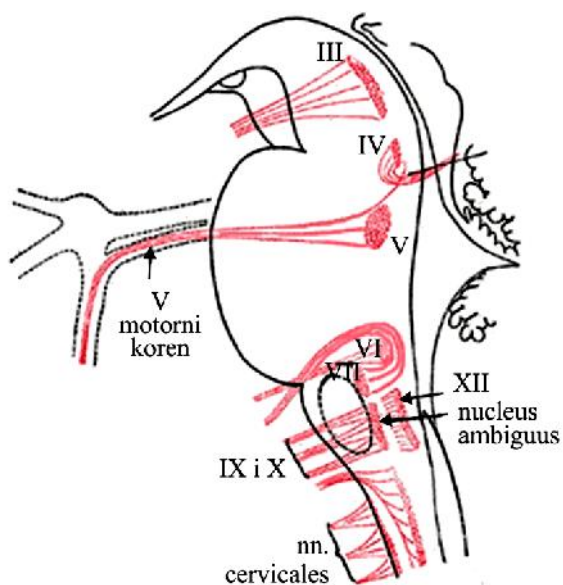
Slika 1.1. Šematski prikaz jedara moždanih živaca u odnosu na funkcionalne nizove.\*

1. OSE jedra (motorna) – opšta somatska eferentna jedra
2. PVE jedra – posebna visceralna eferentna jedra, motorna za miši e škržnih lukova:  
A-*nc. ambiguus*, B-*nc. spinalis nervi XI*,
3. OVE jedra – opšta vegetativna eferentna jedra (parasimpatika)  
C-*nc. accessorius nervi oculomotorii* (*nc. Edinger-Westphal*),  
D-*nc. salivatorius superior* (*nc. lacrimomuconasalis*) i inferior  
E-*nc. dorsalis n. vagi*
4. OVA + PVA jedra – opšta vegetativna aferentna i posebna vegetativna aferentna:  
F-*nc. tractus solitarius* (gustativni deo PVA)  
G-senzorni deo iz organa (OVA)
5. OSA jedra – opšta senzitivna aferentna jedra (kožni senzibilitet): mezencefalna, glavna i spinalna jedra *n. trigemina*
6. PSA jedra – posebna senzorna aferentna jedra (ose aj sluha i ravnoteže): vestibularna i kohlearna jedra

\*Petanjek i Mili , 1997.

*Nucleus salivatorius superior* i *nc. lacrimalis* su parasimpatika jedra, a *nc. solitarius* (neki autori ga nazivaju i *nc. gustatorius*) je gustativno jedro *n. facialis*. Motorni koren *n. facialis* nastaje iz motornog jedra facijalnog živca, a senzorni (*n. intermedius*) iz ganglion *geniculi* (GG), s tim što se preko njega prenose i vlakna iz i ka navedenim strukturama mozga (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013; Tubbs et al., 2013; Patel, 2015).

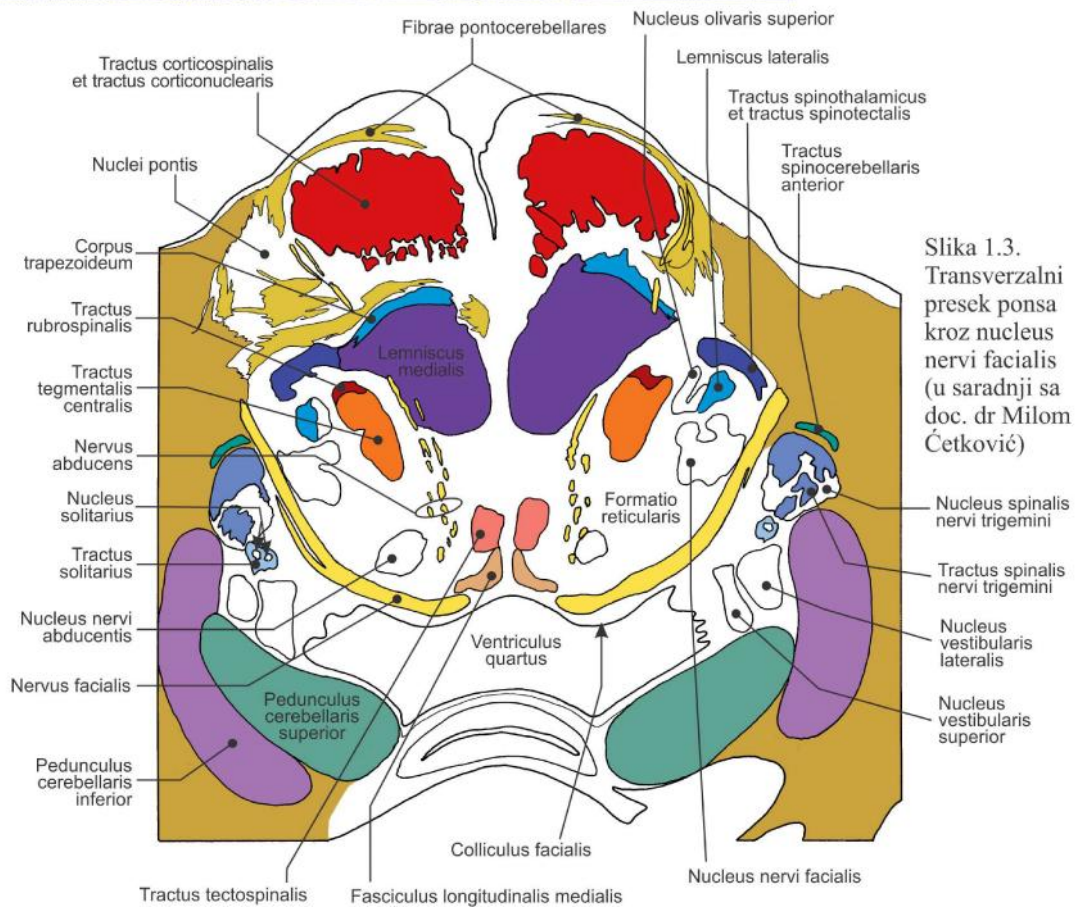
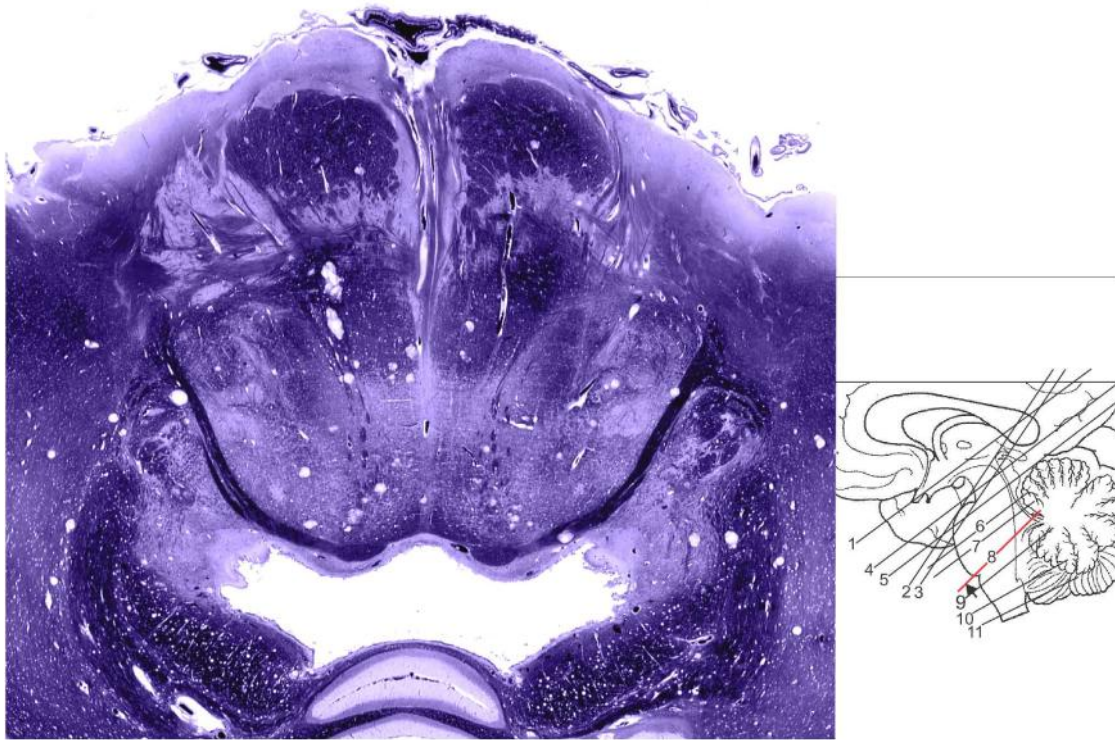
Motorno jedro *n. facialis* spada u specijalno visceroeferentno ili brahijalno jedro, s obzirom da inerviraju miši koji vode poreklo od 2. brahijalnog luka. Lokalizovano je duboko u retikularnoj formaciji ponsa, u njegovom donjem delu, ispred i lateralno od nukleusa *n. abducens*. U svom središtu ono ima jasan somatotopni aranžman koji se postepeno gubi idu i ka periferiji jedra. Mikroanatomske analize pokazale su da se ovo jedro nalazi iznad *nc. ambiguusa*, lateralno od *nc. salivatoriusa superiora* i medijalno od *tr. spinalisa n. trigemini*. Nervna vlakna imaju vrtložni tok u retikularnoj formaciji ponsa i prvo idu unazad i medijalno prema *fossai rhomboidei*, a kada dospeju do zadnjeg kraja *nc. n. abducens* skre u nagore i dospevaju neposredno do srednje linije ispod *colliculusa facialis*. Na prednjem kraju nukleusa *n. abducens*, nervna vlakna prave sekundarnu krivinu i skre u prema dole usmeravaju i svoj tok kroz pons ka nivou oliva, napuštaju i pons neposredno iznad pontomedularnog spoja, izme u VI i VIII kranijalnog živca (slike 1.2 i 1.3) (Grey, 2000; Sachin et al., 2013; Dudek, 2014; Patel, 2015).



Slika 1.2. Šematski prikaz motornih nukleusa kranijalnih nerava u moždanom stablu sa položajem *nc. motorius n. facialis* (bo ni izgled)

Supranuklearna kontrola motornog jedra *n. facialis* ostvaruje se putem *tr. corticonuclearisa*. Naime, iz premotornog korteksa, a potom iz motornog korteksa, vlakna dospevaju preko navedenog puta do bilateralnih motornih nukleusa *n. facialis* u ponsu, a odatle do facijalnih miši a. Postoje bilateralne projekcije ovog traktusa na gornjem delu nukleusa ( ime se vrši kontrola kontrakcije miši a gornjeg dela lica), kao i kontralateralne projekcije na donjem delu (zbog ega kod ošte enja *n. facijalisa* centralnog porekla nastaje pretežno paraliza miši a donjeg dela lica suprotne strane). Uvažavaju i iznete injenice, jasno je da centralna ošte enja *n. facijalisa* mogu biti lokalizovana u prostoru izme u *gyrusa precentralisa* i motornog jedra u ponsu. S druge strane, postoje projekcije iz motornog jedra

facijalnog živca do ekstrapiramidalnog trakta, malog mozga i drugih nukleusa moždanog stabla (npr. nukleusa n. V, gornjeg olivarnog kompleksa, nukleusa n. VIII itd.) (Grey, 2000).



Slika 1.3. Transverzalni presek ponsa kroz nucleus nervi facialis (u saradnji sa doc. dr Milom Četković)



Visceralni nukleusi *n. facialis* su: *nc. salivatorius superior*, *nc. lacrimalis* i *nc. tractus solitarii (pars superior)*.

Efektorna parasimpatika sekretorna vlakna potječu iz *nc. salivatorius superior* i *nc. lacrimalis*, pa se ova jedra klasifikuju u funkcionalnom pogledu u visceroefektorna parasimpatika jedra (Kukumberg et al., 2015).

Što se tiče *nc. tractus solitarii (pars superior)*, radi se o posebnom vegetativnom aferentnom jedru (gustatorne prirode) (Grey, 2000, *Nucleus salivatorius superior* se nalazi u tegmentumu ponsa. Njegove elije razbacane su u retikularnoj formaciji ponsa, dorzomedijalno od motornog jedra facijalisa. Deo ovog nukleusa označava se kao *nc. lacrimalis*. Ovaj nukleus generalno daje sekretomotorna parasimpatika vlakna koja su u sastavu *n. petrosus major* i *chorda tympani*. Naime, neka preganglijska vlakna iz ovog nukleusa pružaju se u sastavu *n. petrosus major*, kroz *canalis pterygoideus*, gdje se spajaju sa postsinaptičkim vlaknima *n. petrosus profundus* (nastalog od simpatika kog spleta *pl. catotica internus* iz gornjeg cervikalnog gangliona), grade i tako *n. canalis pterygoidei Vidi*; konačno, ova vlakna stvaraju sinapse u *ganglion pterygopalatinum* (vegetativnom parasimpatikom ganglionu glave), odakle potječu postganglijska postsinaptička vlakna koja inervišu sluznu žlezdu i mukozne žlezde nosa, nepca i farinksa. Preganglijska parasimpatika vlakna distribuirana su delimično i u sastavu *chordae tympani*, koja se priključuje *n. lingualis* te preko njega ova vlakna dospevaju do submandibularnog gangliona (vegetativnog parasimpatika kog gangliona), a potom kao postganglijska parasimpatika vlakna do sublingvalne i submandibularne žlezde i malih pljuvačinih žlezda u prednjem delu jezika (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013).

Što se tiče *nc. tractus solitarii (NTS, s. nucleus solitarius)*, radi se o visceroaferentnoj seriji jedara (klastera nervnih elija) smeštenih u *meduli oblongati*. Ova jedra formiraju vertikalnu kolumnu sive mase produžene moždine. Kroz centar NTS prolaze snopovi nervnih vlakana uključujući i vlakna VII, X i XI kranijalnog nerva, koja inervišu NTS. Projekciona vlakna iz NTS idu ka retikularnoj formaciji, parasimpatikom preganglijskim neuronima, hipotalamusu i talamusu, stvaraju i nervne krugove koji učestvuju u autonomnoj regulaciji mnogobrojnih vitalnih funkcija. Nervne elije u NTS koje su uključene u percepciju ukusa nalaze se u gornjem, rostralnom delu traktusa. Ovaj centar prima gustativne nadražaje iz prednje dve trećine jezika (*papillae fungiformes* i *papillae foliatae*), putem aferentnih senzornih vlakana koja se nalaze u sastavu *n. lingualis*, tj. *chordae tympani* i potom *n. intermedius*. Znači, ovaj ganglion prima gustativne senzacije iz prednje 2/3 jezika preko perifernog vlakna ganglijskih elija *ganglion geniculi*. Međutim, kao što je već napomenuto,

u NTS tako e dospevaju i ushodna gustativna vlakna iz IX i X moždanog nerva (Grey, 2000; Toulgout et al., 2013; Patel, 2015).

### 1.2.2. Tok facijalnog nerva

Prema toku, od mesta izlaska iz mozga do izlazišta iz lobanje, živac ima nekoliko topografskih segmenata: cisternalni, intrakanalikularni, petrozni segment (labirintni, timpani ni i mastoidni deo) i segment u *foramenu stylomastoideumu* i parotidnoj pljuva noj žlezdi. Dužina segmenata pregledno je data u tabeli 1.1. Facijalni živac od svog mesta izlaska iz ponsa do parotidnog pleksusa je dug 56-74 mm (Fitzgerald, 2012, Patel, 2015).

Tabela 1.1. Segmenti *n. facialis* i njihova dužina

Segment	Lokalizacija	Dužina, mm
Cisternalni segment	<i>cisterna pontocerebellaris</i>	nepoznata / 7-10 mm
Intrakanalikularni (meatusni)	<i>meatus acusticus internus</i>	13-15 mm
Petrozni segment	<i>canalis n. facialis</i>	
labirintni	<i>fundus meatus acustici interni do hiatus can.</i>	3-4 mm
timpani ni	<i>n.p.m.</i>	8-11 mm
mastoidni	<i>ganglion geniculi do eminentia pyramidalis</i> <i>eminentia pyramidalis do foramen stylomastoideum</i>	10-14 mm
Ekstratemporalni segment	<i>foramen stylomastoideum do pes anserinus</i> <i>(plexus parotideus)</i>	15-20 mm

#### Cisternalni segment *n. facialis*

Ovaj segment odnosi se na put živca od izlaska iz moždanog stabla, kroz moždane ovojnice do *metus acusticus internus*. Motorna vlakna facijalisa nakon adheriranja na pons u dužini od 2-3 mm, pružaju se prema gore i lateralno u *cisterna pontocerebellaris*. Nervus intermedius je teorijski odvojen od motornog korena, ali je u bliskom kontaktu sa facijalnim živcem i ne može se odvojiti od njega ak ni hirurškim putem. Korena zona (engl. *rooth exit zone*, REZ) nalazi se u nervu do oko 2 mm udaljenosti od mesta izlaska korenova iz ponsa (mada ta udaljenost može da bude i do 21 mm), i teorijski odgovara zoni u kojoj se oligodendrociti smenjuju sa Švanovim elijama, tj. zoni nastanka perifernog nerva (Tougoat et al., 2013). U samom pontocerebelarnom uglu facijalni živac i *n. intermedius* nalaze se iznad i nešto ispred VIII moždanog živca, pri emu se *n. intermedius* nalazi izme u *n. facialis* i *n. vestibulocochlearisa* (Grey, 2000; Toulgoat et al., 2013, Patel, 2015).

### **Intrakanalikularni (meatusni) segment n. facialis (*meatus acusticus internus*)**

Iz *cisternae pontocerebellaris*, facijalni živac zajedno sa VIII živcem i *a. labyrinthi* ulazi u *meatus acusticus internus*. U ovom hodniku dolazi do spajanja motornog i senzitivnog korena facijalnog živca. Na dnu hodnika (*fundus metus acustici interni*) živac ulazi u prednje-gornji kvadrant, tj. u svoj koštani kanal (*canalis facialis Fallopi*), u piramidi slepoo ne kosti. Po ve ini autora arahnoida na dnu hodnika pravi invaginaciju, koja ponekad dopire do *ganglion geniculi* (Fitzgerald, 2012, Patel, 2015).

### **Petrozni segment (*canalis facialis Fallopi*): *segmentum labyrinthicum*, *segmentum tympanicum* i *segmentum mastoideum***

U svom petroznom segmentu (slike 1.4a,b), facijalni živac je smešten u facijalnom kanalu u piramidi slepoo ne kosti. Ni jedan drugi živac u ljudskom telu nema tako dug tok kroz koštani kanal. Zahvaljuju i tome, inflamatorni procesi u CNS i facijalnom živcu, kao i traumatski ošte enja temporalne kosti, mogu dovesti do vrlo specifi nih komplikacija (Ars, 1986; Alvarez Santana et al., 1991; Bento et al., 2002).

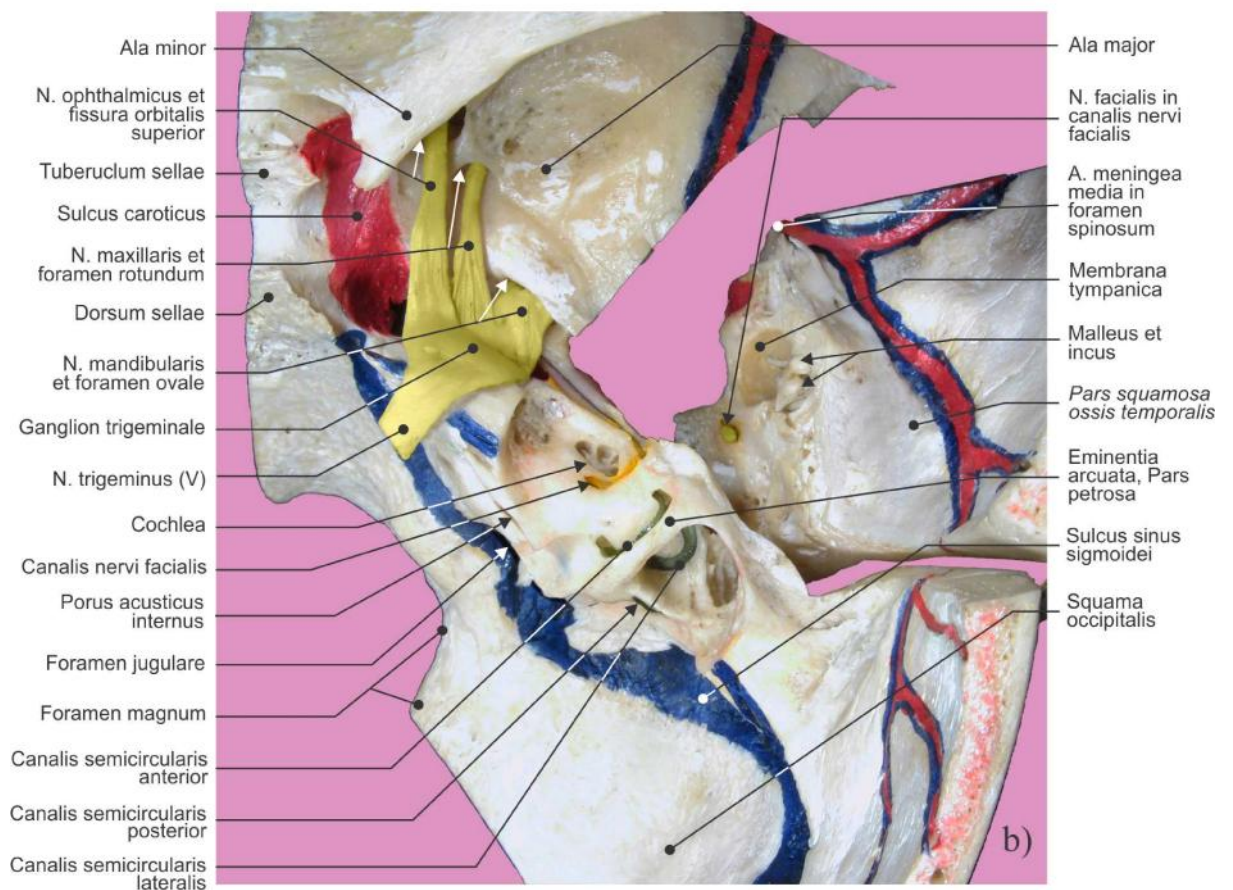
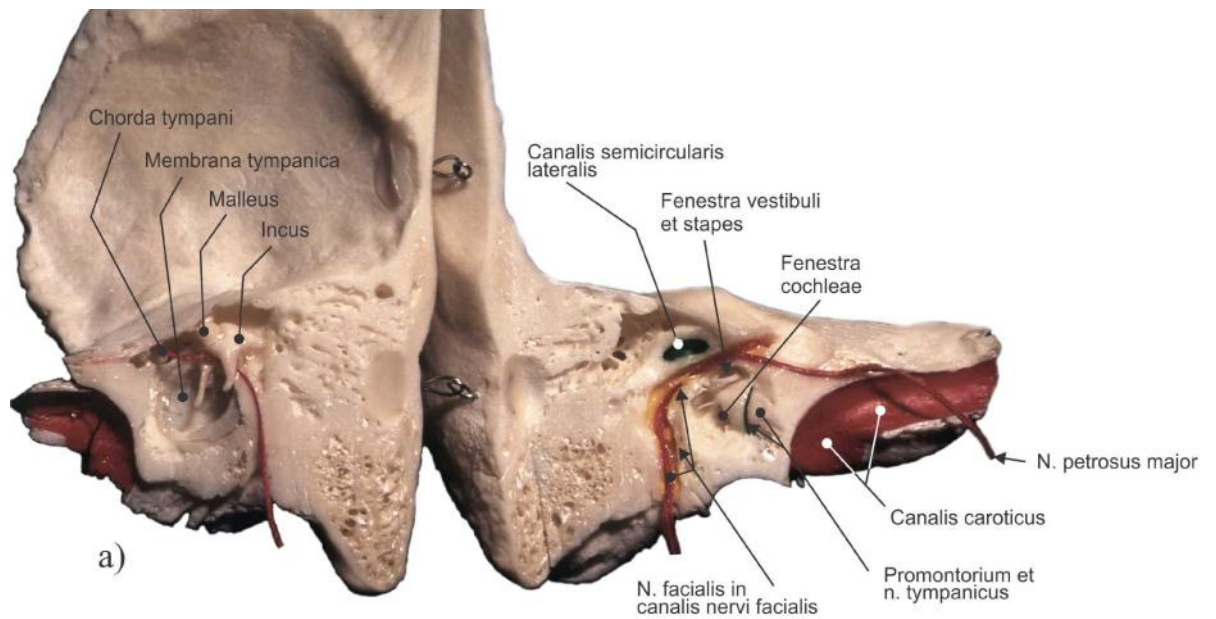
Facijalni živac u kanali u ima najpre kratki horizontalni deo, a zatim naglo skre e nazad u horizontalnoj ravni, prave i koleno (*genu n. facialis*) gde se nalazi njegova mala senzitivna ganglija (*ggn. geniculi*). Od *ggn. geniculi* odvaja se *n. petrosus major*, koji nosi sekretomotorna vlakna za suznu, nosne i nep ane žlezdu. Ovaj segment facijalnog živca naziva se *segmentum labyrinthicum* (s. *segmentum proximale*). On leži ispod srednje lobanjske jame i to je najkra i segment u facijalnom kanalu, koji se pruža perpendikularno na uzdužnu osu piramide. Ovaj segment nazvan je labirintnim segmentom zato što se nalazi neposredno iza *cochleae*. Preciznije, *segmentum labyrinthicum* se nalazi posterolateralno u odnosu na ampularni deo horizontalnog i gornjeg semicirkularnog kanala i ispred *vestibuluma* unutrašnjeg uha. Labirintni segment je najuži deo facijalnog živca, te je osetljiv na kompresiju izazvanu edemom. To je jedini segment facijalnog živca koji nema anastomoze me u arterijama, pa je stoga to podru je podložnije emboliji, niskom krvnom protoku i vaskularnoj kompresiji (Tougoat et al., 2013; Patel, 2015).

Živac se potom pruža ispod medijalnog zida bubne duplje – njegov *segmentum tympanicum* (s. *segmentum horizontale*), na ijem se zadnje-gornjem delu vidi ispup enje njegovog kanala (*prominentia canalis facialis*), koje može da bude sa koštanim defektom (*dehiscencia*) (Rhoton et al., 1968b; Tougoat et al., 2013). Timpani ni segment je dug 8-11 mm i proteže se od *ganglion geniculi* do horizontalnog polukružnog kanala. Živac prolazi iza *processus cochleariformis* i *tensor tympani*, pa je *processus cochleariformis* koristan orijentir za pronalaženje facijalnog živca. Živac se nalazi naspram medijalnog zida *cavum*

*tympani*, iznad i iza *fenestra vestibuli*. Zid može biti vrlo tanak ili može postojati dehiscencija u ovom području, pa sluznica srednjeg uha može doći u direktan dodir sa facijalnim živcem. Dehiscencija u predelu ovalnog prozora je vrlo česta (25-55% obdukcioni slučajeva), te je neophodno uvek predvideti postojanje dehiscencije i prolapsa facijalnog živca u timpaničnom segmentu, naročito kod bolesnika sa kongenitalnim anomalijama uha. Distalni deo facijalnog živca izlazi iz srednjeg uha između zadnjeg zida spoljašnjeg slušnog kanala i horizontalnog polukružnog kanala. To je neposredno distalno od piramidalne eminencije, gde facijalni živac gradi drugo koleno. Najvažniji orijentiri za prepoznavanje *n. facialis* u mastoidnom nastavku su horizontalni polukružni kanal, *fossa incudis* i digastrični greben. Drugo koleno facijalnog živca pruža se inferolateralno u odnosu na lateralni polukružni kanal i to je relativno konstantni odnos. U slučajevima u kojima je lateralni kanal teško prepoznati (npr. kod holesteatoma, tumora i sl.), predlaže se korišćenje drugih orijentira. Digastrični greben ukazuje na bočnu i inferiornu aspekt vertikalnog toka facijalnog živca u temporalnoj kosti. U slabopneumatizovanoj temporalnoj kosti, digastrični greben se teško identifikuje. Distalni aspekt timpaničnog segmenta može biti operativno lokalizovan preko pristupa facijalnom recesusu. *Chorda tympani* i *fossa incudis* mogu da se koriste za identifikaciju živca. Nakon kortikalne mastoidektomije, istanjenjem zadnjeg zida kanala može se pristupiti facijalnom nervu. Facijalni recesus se identifikuje pomoću *incusa*, *chordae tympani* i horizontalnog polukružnog kanala kao orijentira (slike 1.4a,b; 1.5) (Tougoat et al., 2013; Patel, 2015).

Živac zatim opet naglo skreće naniže ispod ulaza u mastoidnu pešinu (*antrum mastoideum*) postičući i vertikalni položaj. Taj deo živca (*segmentum mastoideum*), pruža se kroz istoimeni zadnji zid bubne duplje. Drugo koleno označava poetak segmenta mastoidnog nastavka. Ovo koleno nalazi se bočno i iza *processus pyramidalis*. Živac nastavlja okomito prema dole duž prednjeg zida mastoidnog nastavka do stilomastoidnog foramena. Mastoidni segment je najduži deo petroznog segmenta facijalnog živca i dug je 10-14 mm. Kod operacije srednjeg uha, česte su povrede facijalnog nerva baš u ovom segmentu (Lang et al., 1981).

Od mastoidnog segmenta *n. facialis* odvajaju se: (1) *n. stapedius* i (2) *chorda tympani*. Takođe, *n. facialis* duž ovog segmenta priključuje se i živac iz *r. auricularis n. vagi* (Arnoldov nerv). Naime, ušna grana vagusnog živca nastaje u *foramenu jugulare* i priključuje se *n. facialisu* neposredno ispod mesta odvajanja *n. stapediusa*. Bol iz *meatus acusticus externus* može se preneti preko ovog živca (Monthouse, 1990; Gray, 2000).

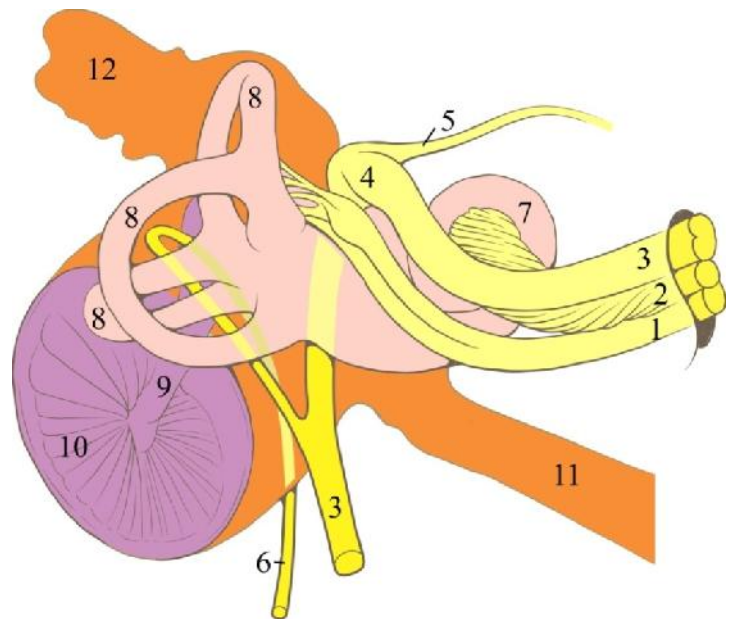


Slika 1.4a,b. Os temporale, uzdužni presek i disekcija (u saradnji sa prof. M. Milisavljevićem)

Slika 1.5. Odnos VII i VIII kranijalnog nerva sa nekim strukturama srednjeg i unutrašnjeg uha\*

1. *n. vestibularis*
2. *n. cochlearis*
3. *n. facialis*
4. *ggl. geniculi*
5. *n. petrosus major*
6. *chorda tympani*
7. *cochlea*
8. *canales semicirculares*
9. *malleus*
10. *membrana tympanica*
11. *tuba auditiva*
12. *antrum mastoideum*

\*Fitzgerald et al., 2012.



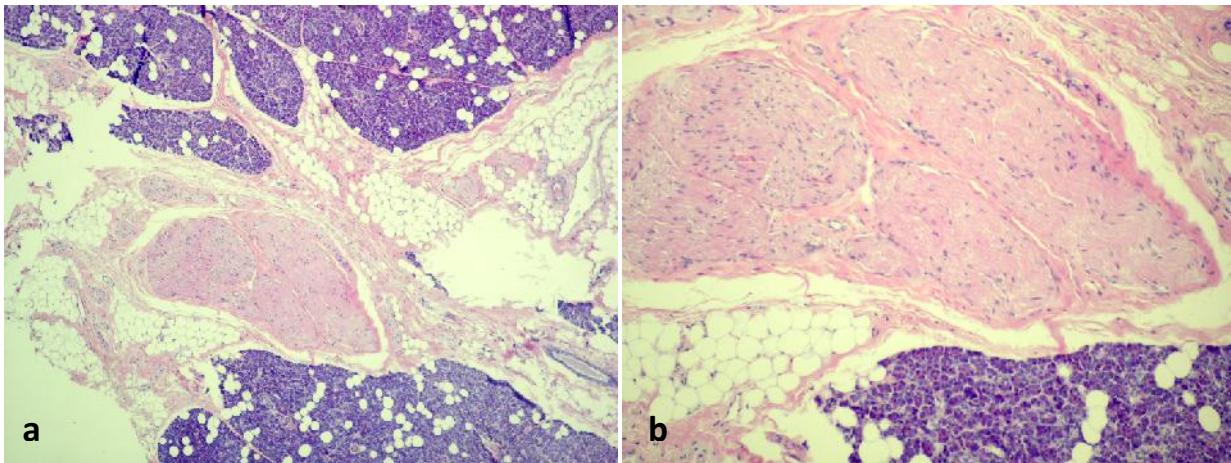
### Segment koji prolazi kroz *foramen stylomastoideum* i parotidnu žlezdu

Živac napušta lobanju kroz otvor na bazi lobanje (*foramen stylomastoideum*) izme u mastoidnog i stiloidnog nastavka. Kada napusti stilomastoidni foramen, facijalni živac nastavlja svoj tok put napred i dole, izme u digastri nog i stilohoidnog miši a, i ulazi u parotidnu žlezdu. U tkivu parotidne žlezde ukršta *a. carotis externu* i deli se iza *ramusa mandibulae* na brojne završne grane motornog tipa koje se distribuiraju ka bo noj strani glave i lica i gornjem dela vrata, inervišu i potkožne miši e ovih anatomskih regija. U samoj parotidnoj žlezdi *n. facialis* se prvo deli na dva stabla – *truncus temporofacialis* i *truncus cervicofacialis* iza *v. retromandibularis* (slika 1.6a,b,c). Od grana ovih stabala u žlezdi formira se *plexus parotideus n. facialis*, od koga se izdvajaju opisane završne grane (Moukhouse, 1990; Grey, 2000; Patel, 2015).

Hirurški orijentiri za *n. facialis* u ovom segmentu su linija timpanomastoidne suture, tragusni orijentir i zadnji trbuh *m. digastricus*. Timpanomastoidna sutura leži izme u mastoidnog nastavka i timpani nog segmenta temporalne kosti i nalazi se 6-8 mm bo no u odnosu na stilomastoidni foramen. Glavno stablo živca tako e može da se na e na pola puta (10 mm posteroinferiorno) izme u medijalne ivice hrskavice tragusa, tzv tragusni orijentir, i zadnjeg trbuha *m. digastricus*. Živac se obi no nalazi lateralno i inferiorno od ovog orijentira (Tougoat et al., 2013; Patel, 2015).

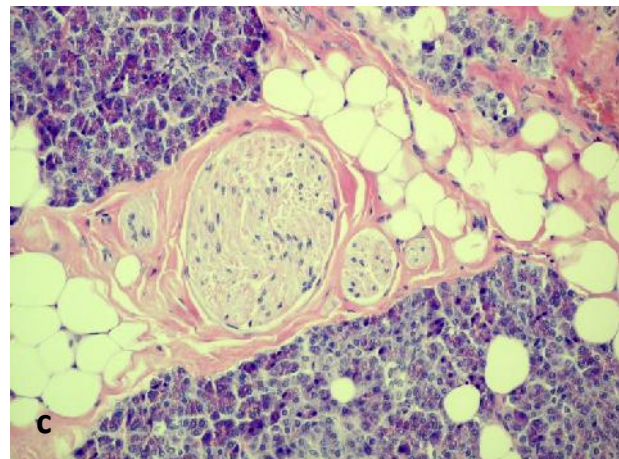
Tokom hirurškog seciranja, može da se nai e na granu okcipitalne arterije koja se nalazi bo no u odnosu na facijalni živac. Brzo krvarenje u tom trenutku može biti znak da je živac u neposrednoj blizini; hemostazu je potrebno uraditi bipolarnom elektrokauterizacijom i

dalja disekcija treba da se nastavi oprezno. Stiloidni nastavak je duboko u odnosu na glavno stablo živca. Kod odojadi i male dece, ovi orijentiri ne važe zbog razlika u brzini anatomskog razvoja parotidne žlezde i mastoidnog nastavka. Kod njih se facijalni živac nalazi više površno, a rizik od povrede poveća se s podizanjem kožnog reznja (Tougoat *et al.*, 2013; Patel, 2015).



Slika 1.6a,b,c. Facijalni živac u svom toku kroz parotidnu žlezdu zamorca (ljubaznoš u prof. dr Vere Todorovi )

Vidi se *truncus temporofacialis* (a i b) i *plexus facialis* (c). Hematoksilin-eozin (H&E); 1a, x10; 1b i 1c x20.



### 1.2.3.Bo ne i završne grane *n. facijalisa*

U piramidi petrozne kosti od *n. facialis* se odvajaju **bo ne grane (intrapetrozne bo ne grane)**: *n. petrosus major* (u labirintnom segmentu, u nivou *ggn. geniculi*); *n. stapedius*, *chorda tympani* i senzitivne grane za aurikularni region (u mastoidnom segmentu). U nivou timpani nog (horizontalnog) segmenta nema grananja facijalnog živca (Grey, 2010).

*Nervus petrosus major* nastaje u nivou *ggn. geniculi* i sadrži parasimpatika vlakna iz *n. intermedius*. On prolazi kroz *hiatus canalis n. petrosi majoris* i izlazi na površinu – na prednju stranu piramide, gde ide duž istoimenog žleba (*sulcus n. petrosi majoris*). Odavde produžava ispod *ganglionae trigeminalae* i prolazi kroz *foramen lacerum*, gde mu se

pridružuje simpati ki živac *n. petrosus profundus*, iz *plexus caroticus internus* (simpati ka vlakna iz *ganglion cervicale superius*). Ova dva živca prolaze kao jedinstveni živac (*n. canalis pterygoidei*), kroz istoimeni kanal u korenu *processus pterygoideus*, koji se završava u *ggn. prerygopalatinum*, smeštenom u *fossa pterygopalatina*. Postganglijska vlakna iz ove ganglije inervišu, preko *n. maxilaris* (V2) i njegove grane *n. zygomaticus*, suznu žlezdu, žlezde nosa i nepca i faringealne žlezde. Ushodno, *n. petrosus major* prenosi i deo gustativnih vlakana iz nepca preko *n. palatinus major et minor*. Ovaj živac tako e obezbe uje parasimpati ku inervaciju za sfenoidni, frontalni, maksilarni i etmoidalni sinus i nosnu šupljinu. Nervus petrosus major tako e sadrži i gustatorna vlakna iz mekog nepca, koja dolaze preko *n. palatinus minor* i *n. palatinus major* (Patel, 2015).

**Komunikantna grana za ggl. oticum** nastaje u nivou ggl. geniculi i spaja *n. petrosus major* i *ggl. oticum* (Grey, 2010; Patel, 2015).

*Nervus stapedius* je tanka grana koja se odvaja od facijalnog živca odmah iznad eminentiae pyramidalis. U ovoj eminenciji smešten je *m. stapedius*, najmanji miši u telu oveka, koga inerviše ova grana (Grey, 2010, Patel, 2015).

*Chorda tympani* je terminalna grana *nervusa intermeduisa*. Ona se odvaja od vertikalnog (mastoidnog) segmenta facijalnog živca, oko 6 mm iznad *foramena stylomastoideuma*. Živac prolazi kroz uzani kanali *paries mastoideusa* bubne duplje i ulazi u *cavitas tympanica* probijaju i njen zadnji koštani zid, gde ima lu ni tok po unutrašnjoj strani bubne opne, i to izme u *pars flaccidae* i *pars tensae*. Pritom prolazi izme u bubne opne i *manubrium mallei*. Zatim se pruža kroz kanali u prednjem delu bubne duplje, izlazi kroz *fissuru petrotympanicu (canalis Huguier)*, iza *art. temporomandibularisa*. Horda zatim ukšta *a. meningeu mediu* i po etni deo *n. auriculotemporalisa* i priklju uje se otpozadi i pod oštrim uglom *n. ligualisu* (grani *n. mandibularisa*, V3) u *fossi intratemoporalis*. Horda donosi lingvalnom živcu preganglijska parasimpati ka sekretomotorna vlakna za submandibilarnu i sublingvalnu žlijezdu i male pljuva ne iz prednjeg dela jezika. Ova vlakna se prekidaju u submandibularnom ganglionu. Istovremeno, horda dobija preko lingvalnog živca posebna senzorna aferentna vlakna, tj. gustativna vlakna iz prednje dve tre ine jezika, tj. iz *papillae fungiformes* i *papillae foliatae*, kao i senzorna vlakana sa zadnjeg zida *meatus acusticus externusa*, odgovorna za bol, temperaturu i dodir (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Vanpetrozne bo ne grane *n. facialisa*** su: *n. auricularis posterior*, *r. digastricus*, *r. stylohyoideus* i *r. cutaneus* (Grey, 2010, Patel, 2015).

*N. auricularis posterior* nastaje im *n. facialis* iza e iz lobanje i kre e se unapred ispred *processus mastoideusa*. On se tu spaja sa *r. auricularis n. vagi* i komunicira sa



zadnjom granom *n. auricularis magnus* i *n. occipitalis minor*. Kako se potom ovaj živac penje izme u *meatus acusticus externus* i *processus mastoideus*, on se deli u aurikularnu i okcipitalnu granu. Aurikularna grana inervira zadnji aurikularni i zakrčljale unutrašnje miši e aurikule. Okcipitalna grana je duža, prolazi uz i iza *linea nuchae superior* okcipitalne kosti i inervira okcipitalni trbuh *m. occipitofrontalis* (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Ramus digastricus** se odvaja tako e neposredno nakon izlaska živca iz *foramen stylomastoideum* i grana se u nekoliko granica koje inervira *m. digastricus - venter posterior*, a jedna od njih se spaja sa *n. glossopharyngeus* (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Ramus stylohyoideus** esto se odvaja zajedno sa *ramusom dygastricusom*, ali je od njega duži i tanji. Ovaj živac doseže do *m. stylohyoideus* (srednjeg dela) i inervira ga.

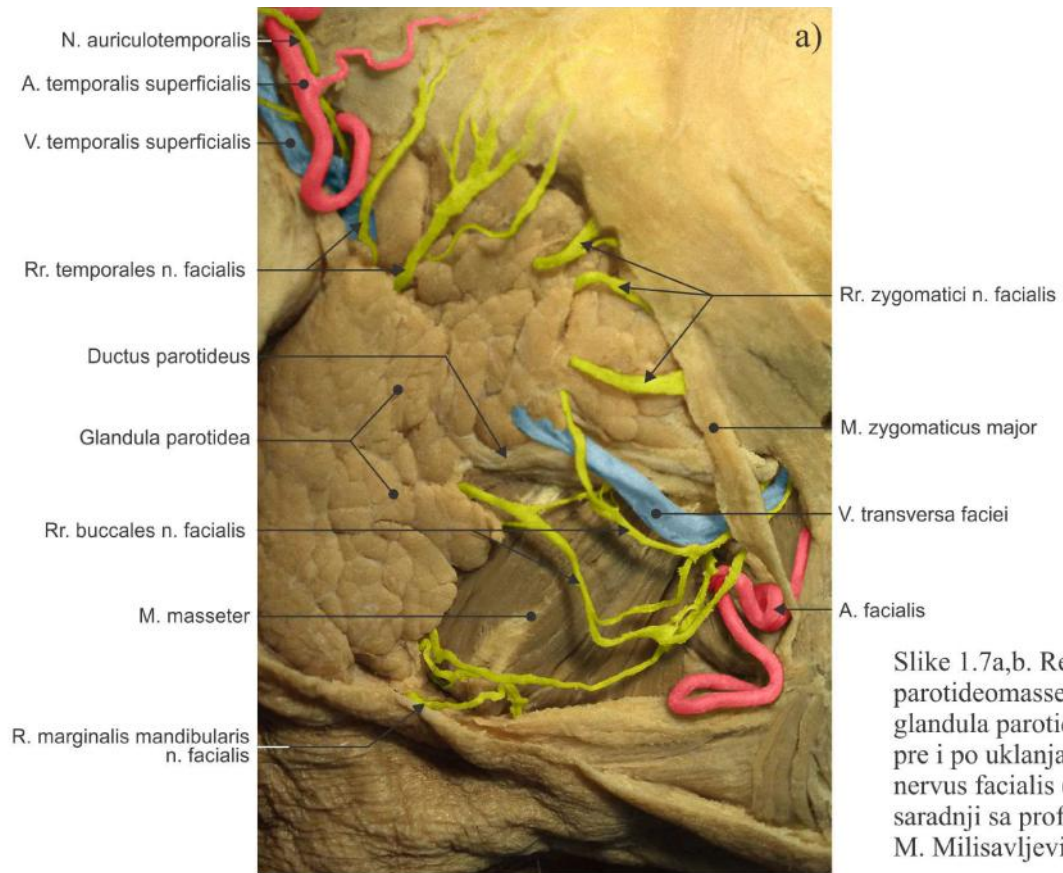
**Ramus cutaneus** je grana koja inervira kožu ušne školjke u predelu njene *conchae*. Ova senzorna vlakna prikljuuju se *r. auricularis n. vagi* (Grey, 2010, Patel, 2015).

Kao što je ve napomenuto u parotidnoj žlezdi facijalni živac se deli u dve glavne grane (na na in *pes anserinus*, guš je stopalo) – superiorno usmerenu temporofacijalnu granu i inferiorno usmerenu cervicofacijalnu granu. One grananjem daju facijalni plexus. Od ovog plexusa, grananjem u vidu lepeze, nastaje pet glavnih **završnih grana facijalnog nerva**: *rr. temporales*, *rr. zygomatici*, *rr. buccales*, *r. marginalis mandibulae* i *r. colli s. r. cervicalis* (tabela 1.2). Ove grane inervira sve mimi ne miši e lica. Od njih, završne grane facijalnog živca inervira 14 od 17 parnih grupa miši a lica, dok tri preostala para miši a (*m. buccinator*, *m. levator anguli oris* i *m. mentalis*) *n. facialis* inervira svojim površinskim ili bo nim granama. Postoje este anastomoze izme u bukalnih i zigomati nih grana. Temporalne grane i *r. marginalis mandibulae* su obi no terminalne i bez anostomoza, pa je prilikom hirurških intervencija njihova povreda esta (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Rami temporales** (2-3 ukupno) izbijaju na površinu *arcusa zygomaticusa*, odatle se pružaju koso preko zigomati nog predela i inervira *m. auricularis anterior et superior*, *n. occipitofrontalis (venter frontalis)*, *m. orbicularis oculi* i *m. corrugator supercilii* (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Rami zygomatici** ukrštaju jabu nu kost i pružaju se do bo nog dela orbite gde inervira lateralni deo *m. orbicularis oculi* (slike 1.7a,b) (Grey, 2010, Patel, 2015).

**Rami buccales** naj eš e je singularni živac ali može biti i dvostruki. Ove grane nalaze se u neposrednoj blizini parotidnog kanala. Inervira ve inu mimi nih miši a u predelu obraza (*m. zygomaticus minor*, *m. levator labii superioris*, *m. levator labii superioris alaeque nasi*, *m. risorius*, *m. buccinator*, *m. levator anguli oris*, *m. orbicularis*, *m. nasalis - pars transversa*, *m. nasalis- pars alaris*) (Grey, 2010, Patel, 2015).



Slike 1.7a,b. Regio parotideomasseterica, glandula parotidea, pre i po uklanjanju i nervus facialis (u saradnji sa prof. dr M. Milisavljevićem)

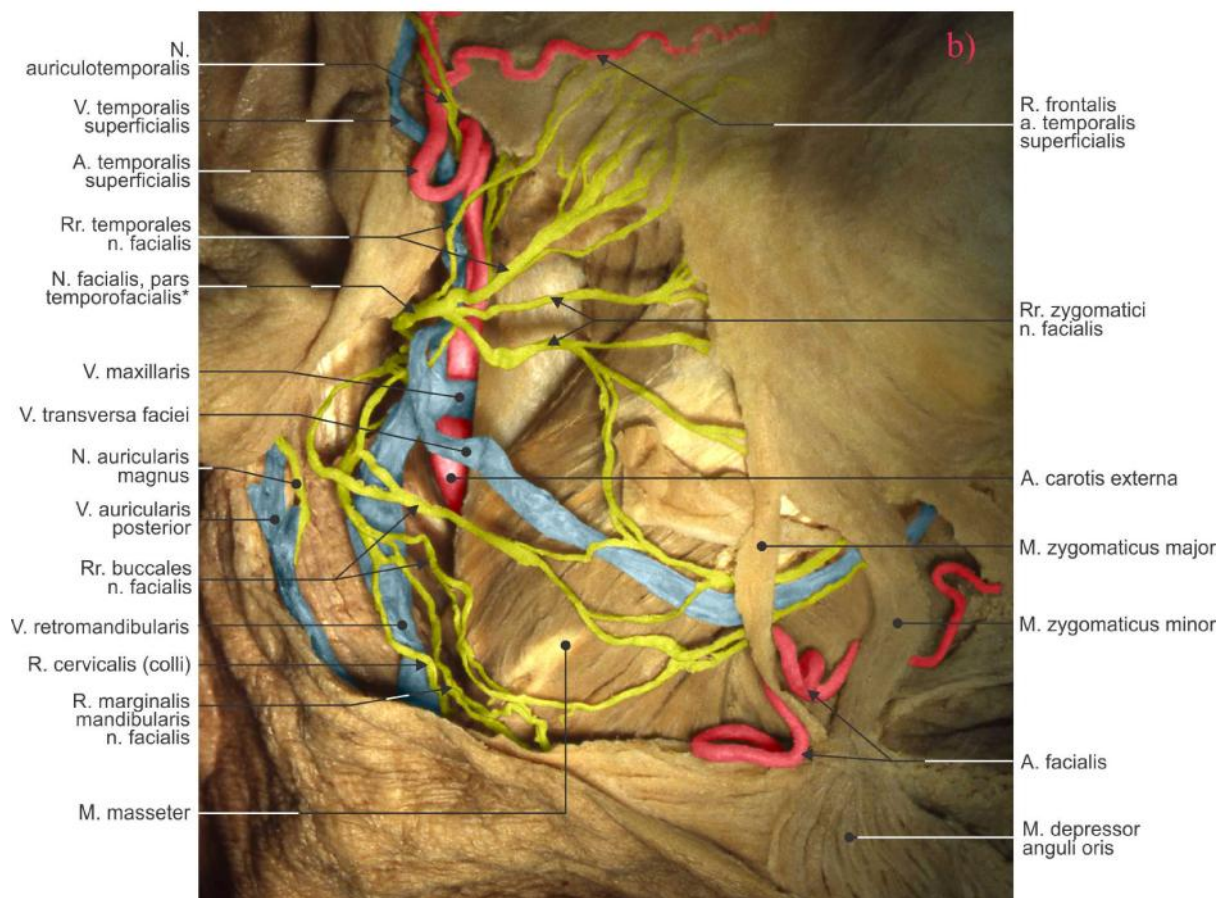


Tabela 1.2. Inervacija i funkcija mimih mišića lica.\*

Živac	Mišići koji inerviraju	Funkcija
<i>N. auricularis posterior</i>	<i>m. auricularis posterior</i>	povlači uvo unatrag
	<i>m. occipitofrontalis</i> , okcipitalni trbuh	povlači i skalp unatrag
<i>Rami temporales</i>	<i>m. auricularis anterior</i>	vuče uho naprijed
	<i>m. auriculatris superior</i>	podigne uho
	<i>m. occipitofrontalis</i> , frontalni trbuh	povlači i skalp unapred
	<i>m. corrugator supercilii</i>	vuče obrvu medijalno i dole
	<i>m. procerus</i>	vuče medijalni dio obrve nadole
<i>Rami temporales et zygomatici</i>	<i>m. orbicularis oculi</i>	zatvara kapke i nabira kožu oko oči
<i>Rami zygomatici et rami buccales</i>	<i>m. zygomaticus major</i>	podigne uglove usta
<i>Rami buccales</i>	<i>m. zygomaticus minor</i>	podigne gornju usnu
	<i>m. levator labii superioris</i>	podigne gornju usnu i srednji dio nazolabijalne brazde
	<i>m. levator labii superioris alaeque nasi</i>	podigne medijalnu nazolabijalnu brazdu i <i>alu nasi</i>
	<i>m. risorius</i>	pomaže stvaranje osmeha
	<i>m. buccinator</i>	bojim povlačenjem podigne uglove usta i komprimira obraz
	<i>m. levator anguli oris</i>	povlači i uglove usta nagore i prema srednjoj liniji
	<i>m. orbicularis</i>	zatvara i pritiska usne
	<i>m. nasalis, dilator naris</i> <i>m. nasalis, compressor naris</i>	širi nozdrve sužava nozdrve
<i>R. buccales et r. marginalis mandibulae</i>	<i>m. depressor anguli oris</i>	povlači i ugao usta nadole
	<i>m. depressor labii inferioris</i>	povlači i donju usnu nadole
<i>R. marginalis mandibulae</i>	<i>m. mentalis</i>	Povlači i kožu brade nagore
<i>R. cervicalis</i>	<i>platysma</i>	Povlači i uglove usta nadole

\*Patel, 2015.

***Ramus marginalis mandibulae*** u vidu jedne ili dve grane pruža se napred i nadole. Ova grana prelazi preko *m. masseter* i *corpus mandibulae*, neposredno ispod donje ivice ove kosti. Inerviraju *m. risorius* i mišići usana i brade (Grey, 2010, Patel, 2015).

***Ramus colli s. cervicalis*** spušta se ispod ivice mandibule. Pruža se od donjeg dela parotidne žlezde do prednje strane vrata i oživljava *platysmu*, jedini potkožni mišić vrata (Grey, 2010, Patel, 2015).

#### 1.2.4. Komunikacija sa drugim kranijalnim nervima i nervnim spletovima

Komunikacija sa drugim nervima i nervnim spletovima facijalnog nerva prikazana je na slikama 1.8, 1.9 i u tabeli 1.3 (Patel, 2015).

Tabela 1.3. Komunikacija n. facialis sa drugim nervima i nervnim pleksusima.

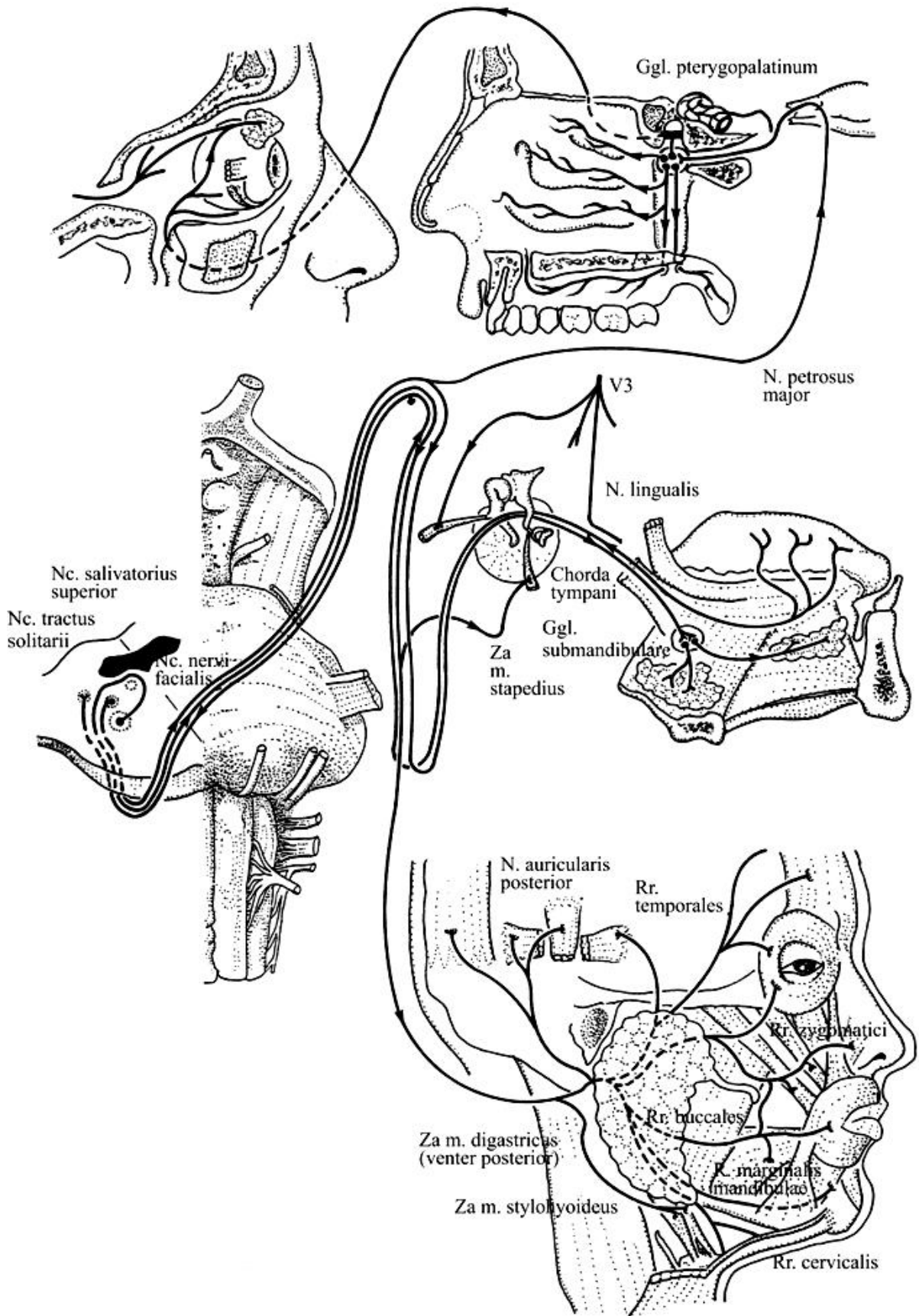
Segment	komunikacija
U meatusu acusticusu internusu	sa n. vestibulocochlearusom (VIII) sa ganglion pterygopalatinum preko n. petrosus majora
U ganglionu geniculi	preko n. petrosusa minor sa ggn. oticumom preko n. petrosusa profundusa sa simpati kim spletom oko a. meningae mediae
U canalis facialis	sa r. auricularis n. vagi
Na izlazu iz foramena stylomastoideuma	sa n. glossopharingeusom (IX) i n. vagusom (X) sa n. auricularis magnusom sa n. auriculotemporalisom
Iza uha	Sa n. occipitalisom minorom
U predelui lica	sa trigeminalnim ganglionom i V živcem
U predelu vrata	sa ramusom cervicalisom i n. transversus cervicalis

Ve je napomenuto da se n. petrosusu majoru pridružuje simpati ki živac n. petrosus profundus, iz plexusa carotica internusa (simpati ka vlakna ggl. cervicale superius). Ova dva živca prolaze kao jedinstveni živac (n. canalis pterygoidei), kroz istoimeni kanal u korenu processus pterygoideus, koji se završava u ggn. pterygopalatinum (Grey, 2010, Tougoat et al., 2013; Patel, 2015).

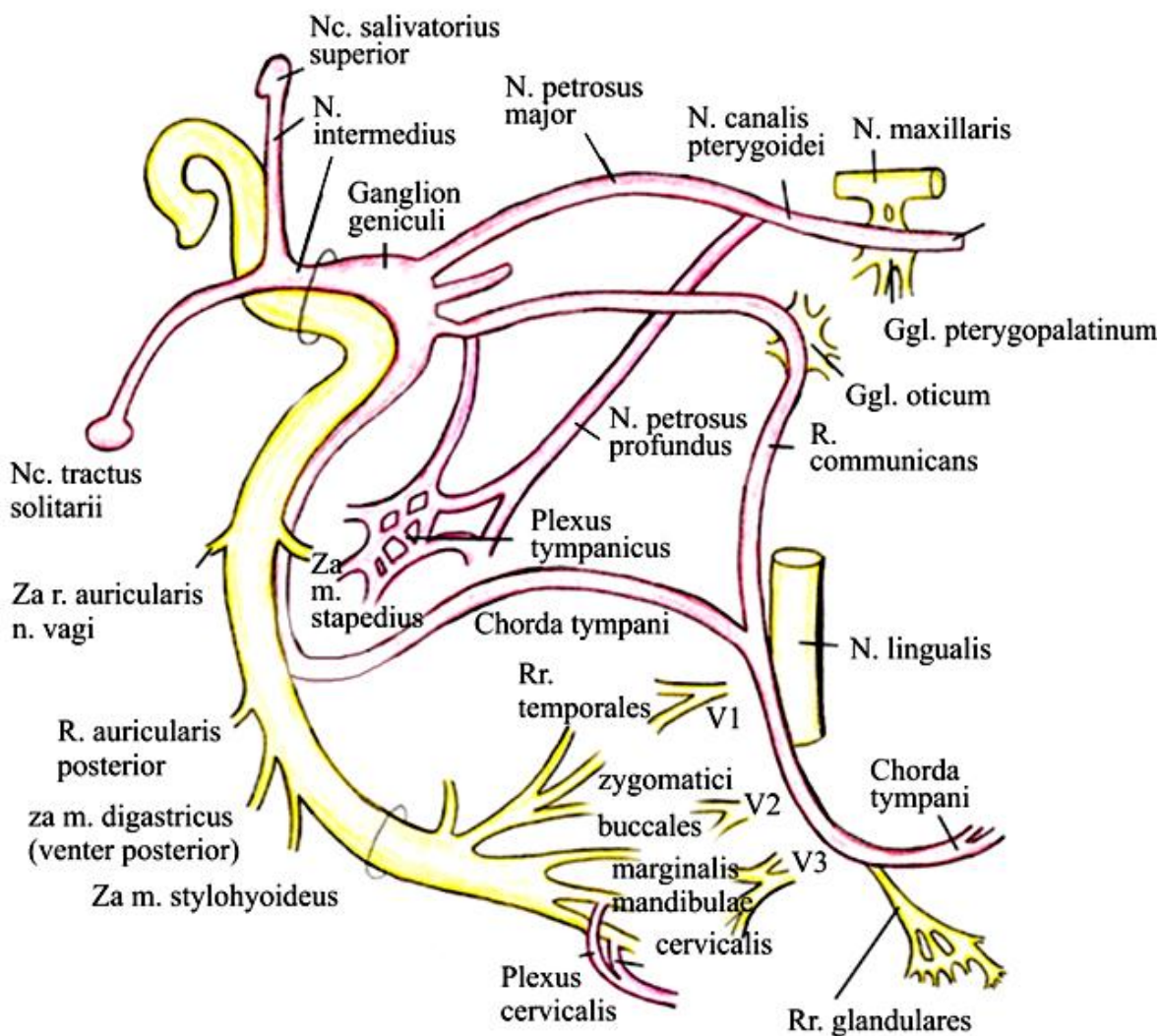
Kao što je ve više puta podvukeno, genikulatni ganglion povezan je sa oti kim ganglionom preko grane n. petrosus minor, kao i sa simpati kim vlaknima oko a. meninga media. Neposredno pre izlaska n. facialis iz foramena stylomastoideuma, on prima granicu iz vagusnog živca (r. auricularis n. vagi) (Patel, 2015).

Nakon što napusti stilomastoidni foramen, n. facialis šalje granicu do n. glossopharingeusa i komunicira sa aurikularnom granom n. vagusa, sa n. auricularis magnus cervikalnog pleksusa, sa n. auriculotemporalis u parotidnoj žlezdi i sa n. occipitalis minor. U predelu lica komunicira sa terminalnim ograncima trigeminalnog nerva, a u predelu vrata sa n. transversus cervicalis (Gaser, 2010).

Znači, može da se zaključuje da n. facialis donosi preganglijska parasimpati ka vlakna (OVE) za dva ganglion – ggn. pterygopalatinum (preko koga ide inervacija za suznu žlezdu) i ganglion submandibularae (preko koga ide inervacija za sublingvalnu i submandibularnu žlezdu). Takođe, povezan je i sa dva simpati ka nervna spleta – oko unutrašnje karotidne arterije i a. meningea media. Od kranijalnih nerava povezan je sa V, VIII, IX i X živcem.



Slika 1.8. *N. facialis*, stablo i grane.



Slika 1.9. Komunikacija *n. facialis* i *n. intermedius* sa drugim nervima.\*

(\*Zapaziti komunikaciju sa V, IX i X kranijalnim nervom; Patel, 2015)

### 1.3. Funkcija *n. facialis* (funkcionalna kategorizacija nervnih vlakana)

Sedmi moždani živac ima motornu (motorni eferentni put), visceralnu (sekretorni eferentni put), senzitivnu i senzornu funkciju ( aferentni putevi). Kao što je već napomenuto, veliki motorni koren *n. facialis* sadrži BE vlakna, a *n. intermedius* sadrži SA vlakna za ukus (gustativna vlakna), koja se završavaju u *nc. solitariusu* i parasimpatika GVE vlakna koja polaze iz *nc. salivatorius superiora* i GSA vlakna usmerena ka spinalnom jedru trigeminusa (Lang, 1981; Grey, 2010, Patel, 2015).

Tabela 1.4. Funkcionalna klasifikacija vlakana facijalnog živca

Tip vlakana	Funkcija
1. opšta somatska aferentna [GSA (engl. General Somatic Afferent)]	opšta senzitivna vlakna koja nose senzacije od <i>meatus acusticus externus</i> i nazad do uha; iz dela temporomandibularnog zgloba; iz <i>concha auricularis</i>
2. somatska aferentna [SA (engl. Special Afferent)]	senzorna vlakna koja nose senzacije ukusa iz prednje 2/3 jezika
2. opšta visceralna eferentna [GVE (engl. General Visceral Efferent)]	eferentna parasimpatička vlakna koja inervišu: -submandibularnu i sublingvalnu žlezdu -suznu žlezdu i mukozne zlezde usta i nosa
3. brahijalna eferentna [BE (engl. Special Visceral/ Branchial Efferent)]	motorna vlakna koja inervišu mišiće 2. brahijalnog luka

Facijalni nerv sadrži specijalnu motornu komponentu koja se razlikuje od somatske motorne komponente drugih živaca. Naime eferentna somatska motorna vlakna svrstavaju se u funkcionalnom smislu u tzv. specijalna visceralna eferentna vlakna koja se označavaju kao *brahijalna motorna eferentna vlakna* (eng. *Branchial motor Efferent*, BE) jer inervišu skeletne mišiće koji se razvijaju iz brahijalnih lukova, a ne iz somita. Tako motorna vlakna facijalisa inervišu mišiće lica i poglavine koji se tokom prenatalnog života razvijaju iz drugog faringealnog luka kao i *m. stapedius*, zadnji trbuh *m. digastricus* i stilohoidni mišić. Opšta visceralna eferentna vlakna (engl. *General Visceral Efferents*, GVE) inervišu suznu, podvilicu i podjezicu žlezdu, kao i sluzokožu nosne duplje i sluzokožu koja pokriva tvrdo i meko nepce. Opšta somatska aferentna vlakna (engl. *General Somatic Afferent*, GSA) prenose do centralnog nervnog sistema osećaj dodira, bola i temperature iz predela *meatus acusticus externus* i dubljih delova *auriculae* (koža ušne školjke u predelu *conchae*), kao i iz kože predela iza uha i dela temporomandibularnog zgloba, dok su specijalna aferentna vlakna (engl. *Special Afferent*, SA) senzorne prirode odgovorna za osećaj ukusa u prednje dve trećine jezika (tabela 1.4) (Grey, 2010; Patel, 2015).

Morfometrijske studije su precizno pokazale koliko ima nervnih vlakana u facijalnom živcu, kod oveka i raznih životinjskih vrsta (mačka, psa, miša) (Buskirk, 1945; Shimoza, 1976). Po tim podacima kod oveka, stablo facijalnog živca distalno od genikulatnog ganglionu ima 12.968 aksona, od kojih su 83% mijelinizovana vlakna, a 17% nemijelinizovana. Približan broj vlakana i odnos mijelinizovanih i nemijelinizovanih vlakana imaju mačka i pas (Buskirk, 1945), dok miš u facijalnom nervu ima duplo manje aksona (Shimoza, 1976).

Elektronskomikroskopska analiza facijalnog živca miša u blizini kolenog gangliona pokazala je da u stablu živca distalno od -gangliona ima u proseku više oko 600 vlakana nego u proksimalnom delu živca. Ovaj ve i broj ide u korist nemijelinizovanih vlakana u odnosu na mijelinizovana (444:165). Kako u facijalnom živcu miša distalno od GG nema motornih nervnih vlakana, kao ni parasimpati kih vlakana, to pove anje pretežno nemijelinizovanih vlakana pripisuje se prisustvu postganglijskih simpati kih vlakana za lice kao i vlaknima *n. petrosus major*. Što se ti e distalnog pove anja broja mijeliniziranih vlakana, ona poti u od senzornih vlakana koja prolaze kroz genikulatni ganglion od stabla facijalnog živca do velikog petroznog nerva (*Shinozawa, 1978*).

Sli ne zaklju ke izvukli su i autori koji su konstatovali pove an broj vlakana u facijalnom stablu distalno od kolenog ganliona kod ma ke, psa i oveka (*Bruskrik, 1945, Foley, 1948*). I pored razli itih spekulacija, koje idu od toga da pove ani broj vlakana nastaje grananjem specijalnih visceralnih eferentnih aksona na nivou gangliona, preko toga da je mogu e da ova vlakna poti u od male grupe vlakana porekla iz motornog jedra facijalisa koja se priklju uju *n. intermedius* u nivou GG i prolaze i kroz njega dospevaju u distalno stablo, do toga da u ganglionu može da se na e mali broj multipolarnih parasimpati kih neurona koji daju vlakna distalno a ne i proksimalno (*Foley, 1948*), zaklju ak je potpuno druga iji i ide u prilog prethodno iznetom zaklju ku u eksperimentu sa miševima (*Shimozawa 1978*). Uo eno je da snopovi vlakana koji povezuju *n. petrosus major* i stablo facijalnog živca distalno od kolenog gangliona zauzimaju lateralnu stranu gangliona kod oveka, psa i ma ke, a da odre eni broj senzitivnih i senzornih vlakana u fracijalnom živcu prolazi kroz veliki petrozni živac do sfenopalatinskog gangliona, a potom ulazi u maksilarni živac. Zna i, ta vlakna su postganglijska simpati ka vlakna lokalizovana distalno od gangliona i *n. pertosus major* i senzorna vlakna koja u ve ini mogu da pro u kroz GG na svom putu od stabla facijalisa do *n. petrosuis major* (slika 1.9).

#### **1.4. Embriologija facijalnog živca i genikulatnog gangliona**

##### **1.4.1. Embrionalni razvoj facijalnog živca (opšta razmatranja)**

Facijalni živac vodi poreklo od drugog brahijalnog luka (hioidnog luka), koji se vrlo rano pojavljuje u akustiko-facijalnom kompleksu. Motorni deo nastaje iz bazalne plo e embrionalnog ponsa, a senzorni iz nervnog grebena. Ovaj kompleks sadrži somatske i brahijalne elemente jedara kranijalnih nerava u jukstapoziciji, što je delimi no odgovorno za anastomoziranje trigeminalnog i facijalnog živca. Tok facijalnog živca, grane i anatomske



odnose mogu e je jasno uo iti u tre em mesecu života, a živac dostiže svoj puni razvoj oko 4. godine života (*Gasser, 1967; 1970; Gasser and May, 1985; Dudek, 2014*).

Tkivo facijalnog živca identifikuje se najranije u tre oj nedelji gestacije, kada se pojavljuje *facio-akusti ni primordijum ili greben* (*Gasser, 1967; 1970; Gasser and May, 1985*). *Epibrahialne plakode* nastaju iz tzv. “pan-plakodalnog” regiona i brojni regulatorni faktori kontrolišu diferencijaciju posebnih plakoda. Kranjalne neurogene plakode nastaju od zadebljanja ektoderma na prednjoj strani nervne plo e (tzv. pre-plakodalni region). Fibroblasti faktori rasta (FGFs) koji se izdvajaju iz nervne plo e i mezoderma, indukuju usmeravanje pre-plakodalnog regiona, a na taj proces uti e i lokalno smanjenje koštanih morfogenih proteina (BMPs) i Wnts. Plakode sadrže klastere progenitornih elija koje e se dalje razvijati u pravcu senzornih ili neurosekretornih organa (*Adameyko and Fried, 2016*). Na kraju 4. nedelje, facijalni i akusti ni deo plakode se jasno razlikuju, facijalni deo nadržta plakodu, a akusti ni deo postaje *otocista*. U petoj nedelji formira se *ganglion geniculi*, iz distalnog dela primordijuma. Potom se facijalni živac deli na dva dela – glavno stablo i *chorda tympani* (prva grana živca koja se pojavljuje u toku embrionalnog razvoja). U toku pete nedelje facialno stablo se ve zna ajno produži, a u nivou ganglionu geniculi, iznad horde timpani se izdvaja petrozni živac (*Wozniak et al., 1993; Weglowski et al., 2015*). Na kraju pete nedelje, i tokom 6. nedelje ve se dobro raspoznaje motorno jedro facijalisa, a motorno jedro VI i VII kranijalnog živca zauzimaju inicijalni položaj neposredno iznad motornog jedra facijalisa. Unutrašnje koleno nervne cevi formira metencefalom koji se izdužuje, a nukleus VI živca se pomera nagore. U 7. nedelji GG je ve dobro formiran, i jasno se uo avaju korenovi facijalnog živca. Proksimalne grane facijalisa (*n. auricularis posterior* i *r. digastricus*) nastaju krajem 6. nedelje, dok se temporofacijalne i cervikofacijalne grane uo avaju po etkom 8. Nedelje. Kona no, krajem 8. Nedelje gestacijskog razvoja nastaje svih 5 završnih grana facijalnog živca (*Gasser, 1967; 1970; Gasser and May, 1985*).

#### **1.4.2. Sticanje neurofizioloških karakteristika neurona genikulatnog ganglionu u toku embrionalnog razvoja i njihovo održavanje u postnatalnom životu**

Specifi ni neurotrofi ni faktori, koji deluju u toku embrionalnog razvi a, uti u na sticanje razli itih neurofizioloških karakteristika neurona GG, koje su fundamentalne za nastanak perifernog neuronskog kruga i funkcionisanje gustativnog sistema uopšte.

Najraniju diferencijaciju gustatornih neurona reguliše itava serija traskripcionih faktora i verovatno BMPs. Uporedo sa diferencijacijom neurona dolazi i do njihove proliferacije tako da je njihov broj tokom embrionalnog života daleko ve i nego kod odraslog

organizma, a potom dolazi do apoptoze ovih elija. Neurotrofini regulišu neke od faza elijskog ciklusa gustatornih neurona. Nakon što gustatorni neuroni postanu postmitoti ke elije, po inje izrastanje aksona. Izrastanje aksona prema epitelu jezika regulišu brojni hemoatraktanti i “hemorepulsivni” faktori, me u kojima su semaforini. Moždani neurotrofi ni faktor (engl. Brain derived neurotrophic factor, BDNF), deluju kao ciljni faktori u završnoj fazi rasta aksona u kojoj aksoni pronalaze ciljna mesta i inervišu gustatorni neuroepitel. Tako e, i u razvoj gustatornih korpuskula uklju eni su brojni faktori, me u kojima su Sox-2, *Sonic hedge hog* i Wnt- -catenin elijska signalizacija. I drugi faktori regulišu razvoj papila i diferencijaciju gustatornih korpuskula, ali su oni najmanje prou eni. Me utim, ispitivanja potvr uju da moždani neurotrofi ni faktor (engl. Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) i neurotrofin 4 (NT4), ne samo da su faktori koji održavaju preživljavanje neurona GG, ve istovremeno imaju važnu ulogu u regulaciji razvoja i prostornog rasporeda fungiformnih papila i dosezanja gustatornih neurona do ovih senzornih struktura. Tako e, nedovoljno su prou eni i molekularni faktori koji regulišu razvoj centralnog neurona putem koga se prenose gustatorni nadražaji do *nc. tractus solitarii*, ali se pretpostavlja da to mogu biti isti faktori koji regulišu razvoj GG kao i razvoj, rast i trasiranje njegovih perifernog aksona prema ciljnim mestima (Krimm et al., 2001; Krimm, 2007).

### **Neurotrofini i njihovi receptori**

Za normalni razvoj gustatornog sistema, neophodni su neurotrofini i njihovi receptori. Neurotrofini su grupa faktora rasta koja uti e na brojne aspekte razvoja senzornih neurona, na njihovo preživljavanje i funkcionisanje.

Kod sisara, familiju neurotrofina ine **nervni faktor rasta** (engl. Nerve growth factor, NGF), **BDNF**, **NT3** i **NT-4**. Neurotrofini pripadaju sekretornim proteinima koji regulišu elijsko preživljavanje, diferencijaciju ili rast. Faktori rasta, kao što su neurotrofini, koji potpomažu preživljavanje neurona, nazivaju se neurotrofi ni faktori. Neurotrofini se sekretuju prevashodno iz ciljnog tkiva ili perifernih ciljnih tkiva, i deluju tako da spre avaju programiranu elijsku smrt okolnih neurona iji aksoni inrevišu ciljna tkiva, pa na taj na in podsti u njihovo preživljavanje. Alternativno, neurotrofini mogu da se sintetišu i sekretuju u samim senzornim ganglijama i duž puta njihove projekcije, kada u estvuju u razvoju neurona pre nego što se popstigne inervacija ciljnog tkiva. Ovi faktori ne samo da regulišu broj neurona uticajem na preživljavanje diferenciranih neurona, ve tako e uti u na preživljavanje, diferencijaciju i proliferaciju prekursora neurona tokom ranog razvi a, kao i u adultnom periodu života. Naime, oni mogu da indukuju diferencijaciju progenitornih elija u zrele neurone tokom razvi a, kao i da stimulišu i kontrolišu neurogenezu (stvaranje neurona iz mati nih elija u odre enim regijama mozga odraslih osoba) (Krimm, 2007).

**Receptori za neurotrofine** klasifikovani su u dve grupe. 1) receptor niskog afiniteta, **p75**, za koji se vezuju sva etiri neurotrofina i koji je lan superfamilije faktora tumorske nekroze (TNFs) i 2) tri vrste receptora sa visokim afinitetom vezivanja za ligande (engl. Tropomyosin receptor kinase ili Tyrosine receptor kinase, **Trk**), koji pripadaju familiji

receptora tirozin-kinaza. NGF se vezuje za TrkA, BDNF i NT-4 se vezuju za TrkB i krnju izoformu koja se naziva Trn-B, a NT-3 se vezuje za TrkC i slabo za trkB, Trn-B i trkA.

**TrkA** ima najveći i afinitet za vezivanje NGF i eksprimira se u peptidergi kim nociceptivnim senzornim neuronima, s obzirom da NGF indukuju ekspresiju gena koji kodiraju sintezu enzima neophodnih za produkciju neurotransmitera u ovim neuronima. **TrkB** ima najveći i afinitet za vezivanje BDNF i NT-4. Vezivanje BDNF za TrkB dovodi do aktivacije više intra elijskih kaskadnih reakcija koje regulišu razvoj neurona i njihovu plastičnost, kao i dugotrajni akcioni potencijal i apoptozu. Novija istraživanja pokazuju povezanost TrkB receptora sa pojavom Alchajmerove bolesti. **TrkC** se obično aktivira vezivanjem za NT-3, a vezivanje za druge ligande je manje značajno. TrkC se prevashodno aktivira u proprioceptivnim senzornim neuronima, a aksoni ovih neurona su deblji od nociceptivnih senzornih neurona koji ekspimiraju TrkA. **Receptor p75 (p75NTR)** ima najveći i specifičnost Trk receptora koji su aktivirani neurotrofinima. Prisustvo p75NTR je naročito važno za povećanje afiniteta vezivanja NGF za TrkA. Pored toga, p75NTR redukuje ubikvitinaciju receptora indukovanu ligandima, i odlaže internalizaciju receptora i njihovu degradaciju. Receptor p75 ima brojna fiziološka dejstva, kao što su povećano preživljavanje neurona u nekim stanjima, a u drugim njihova apoptoza, i uticaj na rast i regeneraciju aksona. U toku postnatalnog razvoja Merkelovih elija kože, koje se smatraju sporoadaptirajućim mehanoreceptornim neuronima tipa I, neophodno je prisustvo na njima specifičnog receptorskog kompleksa sa p75. Tako je p75NTR može da ima važnu ulogu u održavanju senzornih neurona i u njihovoj inervaciji kako u ranom postnatalnom razvoju, tako i u adultnom dobu (*Krimm, 2007*).

U senzornim ganglijama, neurotrofini regulišu rane faze elijskog ciklusa i preživljavanje prekursora neurona. Neurotrofini koji se proizvode duž putanje aksona regulišu rast neurita i njihovo grananje. Oni tako učestvuju i na preživljavanje neurona pre nego što dosegnu do svojih ciljnih mesta. S druge strane, neurotrofini koji se oslobađaju sa ciljnih mesta, kao što su npr. oni oslobođeni iz gustatornih korpuskula, učestvuju u regulaciji diferencijacije neurona i u njihovom preživljavanju, regulišu infiltraciju netvnih vlakana u ciljno mesto inervacije i u stvaranju sinapsi. Tako je, neurotrofini održavaju senzornu inervaciju na normalnom nivou i regulišu funkciju neurona u odraslom dobu. Slika opisana razmatranju kod senzornih neurona uopšteno, za preživljavanje gustatornih neurona GG i petroznog ganglionu u toku embrionalnog razvoja, tako je su neophodni neurotrofini. Miševi sa nedostatkom BDNF ili NT4, imaju na rođenju duplo manje neurona u GG i petroznom ganglionu. Senzorna inervacija opšanih i periferičkih papila smanjena je kod miševa koji su u genetskom pogledu *BDNF*<sup>-/-</sup>, pa kod njih dolazi do degeneracije ovih papila. Periferičke papile se tako gube kod miševa koji su *NT4*<sup>-/-</sup>, ali opšane papile ostaju nepromenjene. Suprotno, kod miševa sa prekomernom ekspresijom BDNF ili NT4 u epitelu jezika, broj gustatornih neurona se udvostručuje, u odnosu na broj ovih neurona kod odraslih miševa. Ovi nalazi pokazuju da su neurotrofini BDNF i NT4 neophodni za preživljavanje gustatornih neurona i gustatornih korpuskula tokom razvoja, ali ostaje nejasno kakva je njihova uloga u održavanju gustatornog sistema kod odraslih (*Krimm et al., 2001*,

*Krim, 2007*). I druga istraživanja na miševima su pokazala da je u ranom embrionalnom razvoju BDNF neophodan za razvoj i diferencijaciju neurona GG, a da u osnovi tog uticaja leži spreavanje apoptoze, odstranjivanjem aktivnosti proapoptotskog gena *Bax* (*Patel and Krimm, 2010a*). Iako preživljavanje gustatornih neurona GG podjednako zavisi od ekspresije BDNF i NT-4, bez obzira gde se bitna ciljna mesta njihovih aksona, pokazano je da su gustativni korpuskuli osetljiviji na nedostatak BDNF nego na nedostatak NT-4 (*Patel et al., 2010*). Međutim, NT-4 reguliše preživljavanje gustatornih neurona ranije u toku embrionalnog razvoja, nego što to čini BDNF, i drugom drugim mehanizmima (*Patel and Kimm, 2012*). Isto tako, NT-4 je efikasniji od BDNF u podsticanju rasta i vezivanja za ciljna mesta neurita ganglijskih ćelija GG, kao i u daljoj supresiji rasta neurita (*Runge et al., 2012*). Uticaj BDNF i NT-4 na razvoj i preživljavanje gustatornih neurona u toku embrionalnog razvoja, ostvaruju prevashodno preko TrkB receptora, ali je moguć i mehanizam dejstva nezavisan od ovih receptora (*Fei and Krimm, 2013*).

Moguć i odgovor na pitanje kakav je uticaj neurotrofina i njihovih receptora u preživljavanju i funkcionisanju neurona u GG odraslih životinja, nalazimo u istraživanjima *in vivo*, na kulturama ćelija GG, izolovanim od pacova različitog uzrasta. Ta istraživanja su pokazala da je izrastanje aksona budućih unipolarnih ganglijskih ćelija genikulatnog ganglionu inicijalno usmereno od strane diskretnih epitelnih plakoda prisutnih u epitelu jezika i mekog nepca, koje se kasnije diferenciraju u gustativne korpuskule. Kako je u ovim plakodama koncentrisana velika količina BDNF, smatra se da je ovaj faktor neophodan za podsticanje i usmeravanje rasta gustatornih aferentnih vlakana prema njima. Istraživanja su pokazala da BDNF podstiče kod pacova rast neurita iz GG 15. i 18. dana embrionalnog života, kao i rast neurita u kulturama ćelija GG koje su izolovane od infanilnih ili adultnih pacova i uzgajane na podlozi od kolagenog gela. Osamnaestog embrionalnog dana, kada aksoni penetriraju pregustatorni epitel *in vivo*, BDNF i dalje nastavlja da ispoljava trofični efekat na neurite. Međutim, u postnatalnom i adultrom periodu, uticaj BDNF je pre svega trofičan. Ovi podaci ukazuju na ulogu BDNF kao hemoatraktanta genikulatnih aksona u toku kritičnog perioda njihovog embrionalnog razvoja, koji uključuje inicijalno izrastanje i usmeravanje, ali ne i u kasnijem stadijumu (*Hoshino et al., 2010*). S druge strane, istraživanja su pokazala da različiti neuroni koji se projektuju iz ganglijskih ćelija GG kod odraslih pacova i inervišu pet različitih zona (fungiformne papile prednjeg dela jezika, opšane papile, papile mekog nepca, papile oko inciziva u tvrdom nepcu i kožu spoljašnjeg uha) imaju specifične obrasce u pogledu genske ekspresije neurotrofina (NGF, NDGF, NT-3 i NT-4) i njihovih receptora (trkA, trkB, trkC, p75 i Trn-B). Šta više, nekoliko pojedinačnih

neurona eksprimiraju više od jednog neurotrofinskog receptora ili više od jednog neurotrofinskog gena. Iako se BDNF zna ajno eksprimira u gustativnim korpuskulima, njegov receptor trkB se ne eksprimira zna ajno u neuronima GG. Ovo ukazuje da se najmanje neki, a možda i ve ina trofi nih faktora koji uti u na zrele senzorne neurone GG, sekretuje iz samog tela tih neurona i da su ti efekti prevashodno parakrini i autokrini. Isto tako, BDNF sekretovan iz gustatornih korpuskula tako e može da deluje paraktino ili autokrino na trkB prisutne na njima. Zna i, zreli neuroni GG mogu da za svoje održavanje koriste sopstvene neurotrofine, pored neurotrofina koji do njih dospevaju iz ciljnih tkiva koja inervišu. Potred toga, autoksina/parakrina mreža faktora rasta i receptora odgovorna je za održavanje gustatornih korpuskula u odraslom dobu (*Farbman et al., 2004*).

Brojna istraživanja su neosporno pokazala da su i za razvoj gustatornih korpuskula, neophodni BDGF i NT-4 kao i njihov receptor trkB. Na ovom mestu treba ista i istraživanje Huanga i Krima, koje je pokazalo kakva je vremenska ekspresija *BDNF*, *NT4/5* i *TrkB* mRNK u toku embrionalnog razvoja gustatornog sistema kod miševa divljeg tipa i transgenih miševa. *NTF4/5* postiže najve u ekspresiju kod embriona starih 12,5 dana u neuronima GG i u jeziku, što ukazuje da su ovi geni uklju eni u rani razvoj i preživljavanje neurona GG i aksona koji se odvajaju od ovih neurona i inicijalno inervišu jezik. U isto vreme gustatorni aksoni izrastanjem dosežu do fungiformnih plakoda, pa je u lingvalnom epitelu ekspresija *BDNF* ve a nego erkspresija *NT4/5* što ukazuje da *BDNF* ostvaruje važnu ulogu na ciljnom mestu. Nakom toga se ekspresija *BNDF* kontinuirano pove ava i u ganglijskim elijama sve do ro enja i smatra se da u njima ima poznu autokrinu ili parakrinu ulogu (*Huang and Krimm, 2010*).

Me utim, iako se BDNF i NT-4 prevashodno vezuju za trkB, oni se tako e vezuju i za pan-neurotrofinski receptor p75NTR. Zato se postavlja pitanje da li je i p75NTR receptor potreban za razvoj i održavanje funkcionalno kompetentnih gustativnih korpuskula u zreloom dobu. Pokazano je da odrasli miševi sa kompletnom mutacijom ovog gena izgube 34% gustativnih korpuskula u opšan enim papilama (sli no kao tokom embrionalnog razvoja), 36% u fungiformin i 26% u filiformnim papilama. Pošto se ovaj receptor eksprimira u elijama gustatornih korpuskula u prenatalnom razvoju, smatra se da je klju ni faktor u razvoju potpuno funkcionalno kompetentnih gustatornih korpuskula u svim papilama. Me utim, on nije bitan u održavanju gustatornih korpuskula u *papillae circumvallatae* kod odraslih, nego je to dejstvo indirektno, pošto elije ovih gustatornih korpuskula kod odraslih ne eksprimiraju p75NTR. Me utim, neuroni GG, koji obezbe uju inervaciju gustatornim korpuskulima u *papillae fungiformes*, eksprimiraju p75-receptor, pa miševi sa kompletnom

mutacijom gena p75, imaju i manje neurona u GG pa samim tim i manje gustatornih korpuskula u ovim papilama (Krimm, 2006).

#### 1.4.3. Faktori važni za rast i diferencijaciju neurona GG

Među drugim faktorima koji imaju mogući uticaj na normalni razvoj somatosenzornih neurona u GG, ističe se Hmx1, varijanta homeodomenskog transkripcionog faktora koji se eksplicira u toku razvoja u senzornim nervima, retini i kraniofacijalnom mezenhimu. Od nedavno je ustanovljeno da su mutacije na Hmx1-lokusu odgovorne za neke defekte u kraniofacijalnoj regiji kod ljudi, pacova i miševa, ali je nedovoljno poznata njegova uloga u razvoju nervnog sistema. Senzorni neuroni u spinalnim senzornim ganglijama i trigeminalnom ganglionu kod mišjih embriona sa genotipom *Hmx1<sup>dm/dm</sup>* koji nemaju detektibilan protein Hmx1, poseduju normalnu neurogenezu i normalno ekspliciraju set markera za senzorne neurone, što pokazuje da Hmx1 nije globalno neophodan za diferencijaciju senzornih neurona iz prekursorskih elija nervnog grebena. Tako gubitak ekspresije Hmx1 nema očigledne efekte na rani razvoj trigeminalnog gangliona, gangliona IX i X živca i spinalnih senzornih ganglija, međutim gubitak ekspresije ovog proteina dovodi do značajnih poremećaja u razvoju GG. Naime, kod embriona kod kojih se ne eksplicira transkripcioni faktor Hmx1 dolazi do razvoja samo zakrčljalog *n. auricularis posterior*, a somatosenzorni nervi su generalno izrazito redukovani u sredini prenatalnog razvoja. Pošto se Hmx1 eksplicira u neuronima GG pre nego što ganglijske elije izađu iz elijskog ciklusa, nije verovatno da je ovaj transkripcioni faktor odgovoran za neurogenezu, pa je verovatno redukcija neurona GG posledica povećane programirane elijske smrti (Quina et al., 2005).

### 1.5. Ganglioni povezani s facijalnim nervom

Tri gangliona povezana su s facijalnim nervom – *ganglion geniculi*, *ganglion submandibulare* i *ganglion pterygopalatinum* (Gasser, 1967; 1970; Gasser and May, 1985; Grey, 2010).

#### 1.5.1. Koleni ganglion facijalnog živca (*ganglion geniculi*)

Koleni ganglion facijalnog živca (*ganglion geniculi*, GG), na preseku se prikazuje kao trouglasta kolekcija vlakana i senzornih neurona, i lokalizovan je u *canalis nervi facialis* petroznog dela temporalne kosti. Opisano je da ganglion ima uglavnom piramidalan ili ovalan oblik i prečnik svega nekoliko milimetara (Nawar et al., 1980; Ge and Spector, 1982).

Ganglion izgrađuju pre svega unipolarni senzorni neuroni i senzitivni neuroni. On dobija vlakna iz senzitivnih, senzornih, parasimpatičkih i motornih komponenti facijalnog nerva, i šalje vlakna za inervaciju suzne, submandibularne i sublingvalne žlezde, jezika, nepca, faringosa, *meatus acusticus externus*, *m. stapedius*, zadnjeg trbuha *m. digastricus*, *m. stylohyoideus* i mišića (Garcin and Pech-Gourg, 1978; Grey, 2010).

Motorna vlakna stižu u ganglion ne prekidaju i se, ili prolaze pored njega, tik uz ivicu. Senzorna vlakna su izdanci samih pseudounipolarnih ganglijskih elija. Njihov centralni nastavak završava se u *nc. tractus solitarius* u produženoj moždini, a periferni izdanak ulazi u sastav *chordae tympani* i završava se na prednje dve trećine jezika, gde inerviše *papillae fungiformes* i *papillae foliatae* (Tubbs et al., 2013).

Senzitivna nervna vlakna su izdanci pseudounipolarnih neurona u samoj gangliji. Njihov periferni deo dopire preko *n. auricularis posteriora* do kože retroaurikularne zone, koju inerviše (bol, dodir, temperatura). Centralni izdanak u okviru *n. intermedius* završava se u *nc. spinalis nervi trigemini* (Liubinova and Bobkova, 1966; Grey, 2010, Patel, 2015).

Parasimpatička vlakna GG su preganglijska vlakna koja potiču od *nc. salivatorius superiora* i dospevaju u ganglion preko *n. intermedius*. Jedan deo ovih vlakana napušta koleno ganglion u prednjem delu i preko *n. petrosus majora* dospeva do ganglion *pterygopalatinum*, odakle potiču postganglijska vlakna za suznu žlezdu, sluznicu nosa i nepca. Drugi deo parasimpatičkih vlakana prolazi kroz ganglion i u sastavu nishodnog glavnog stabla *n. facialis* ulazi u *chordae tympani* i dospeva do ganglion *submandibulare*, gde postganglijska vlakna inerviše submandibularnu i sublingvalnu žlezdu (Patel, 2015).

Generalno, po literaturnim podacima ganglijske elije u GG slične su drugim senzornim ganglijskim neuronima, npr. onima u ganglionu trigeminusa i u dorzalnim ganglionima spinalnih živaca (senzorni spinalni ganglioni). Ima ih prosečno oko 2000 u jednom ganglionu (Lundy and Corteras, 1999). Preživljavanje neurona GG u toku prenatalnog i postnatalnog života, slično kao u drugim senzornim ganglijama, zavisi od neurotrofina, kao što je već prethodno detaljno opisano. Neuroni pokazuju ovalan ili okruglast izgled i imaju veliko svetlo jedro i tamno jedarce. Razlikuju se svetle i tamne elije GG, koje su nasumično raspoređene u ganglionu i aranžirane u vidu lamela, gde elijski klasteri broje u proseku 6 elija. Ganglijske elije su okružene sa manjim ili većim brojem satelitskih elija, koncentrisanih u najvećem broju slučajeva u jednom koncentričnom krugu (tzv. „kapsula“ ganglijske elije), a izuzetno multilamelarno. Iz podataka u literaturi nije moguće zaključiti da li postoje citomorfološke razlike između somatosenzornih i gustativnih neurona. Inače, neki iz poslednje grupe neurona specifični su za pojedine vrste ukusa, dok

drugi reaguju na ve i broj gustativnih modaliteta (*Lundy and Corteras, 1999; Breza et al., 2010*).

Ganglijske elije pripadaju tipu unipolatnih neurona, sa tipi nim izgledom aksonskog brežuljka, dok inicijalni segment aksona ima relativno veliki dijametar i neuobi ajeno veliki broj mikrotubula koje su uklju ene u tzv. brzi elijski transport. U ganglijskim elijama akumulirane su mitohondrije sa gustim telima u matriksu (zbog gustih paralelnih naspramno postavljenih kristi), što ukazuje na izuzetno visok stepen oksidativnog metabolizma i jonskog transporta u ovom delu aksona. Postoji strukturna razlika izme u periferne i centralne grane aksona u pogledu proporcije mikrotubula (neurotubula) prema neurofilamentima – neurotubule su zna ajno brojnije u perifernom okrajku nego u centralnom. Proksimalni deo unipolarnog procesusa je nemijelinizovan, dok je distalni deo mijelinizovan, kao i kod ostalih senzornih ganglija, me utim, mijelinski omota je relativno tanak u odnosu na pre nik aksona (*Kitamura et al., 1982; Spassova, 1983*).

Vrlo interesantne podatke o gustatornim centrima u CNS izneli su Zaidi i sar. i ta studija je pokazala heterogenost me u ganglijskim elijama kolenog gangliona, u smislu njihovih centralnih veza. U istraživanju je koriš eno ozna avanje neurona mozga transsinapti ki, anterogradnom propagacijom virusa pseudorabiesa aplikovanih u fungiformne papile jezika, na takav na in da se inficira mali broj ganglijskih elija genikulatnog gangliona, zajedno sa centralnim neuronom s kojim su povezane. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da su obežene elije mozga bile lokalizirane unutar poznatih gustatornih regija, uklju uju i rostralnu centralnu zonu *nc. tractus solitarii* (NST), glavno mesto aksonskih sinapsi kolenog gangliona n. facialisa i mesto koje sadži najviše neurona koji se projektuju do parabrahialnog jedra ponsa (PBN). Neuroni su tako e na eni i u rostralnoj lateralnog zoni NTS, mestu ulaska trigeminalnih aksona i malog broja centralnih produžetaka iz kolenog gangliona. Tako e neuroni su registrovani i u ventralnom delu NST i retikularnoj formaciji (RF) produžene moždine, koja predstavlja kaudalni put moždanog stabla koji upravlja refleksnim motornim funkcijama usne duplje. Na svakoj od lokalizacija nalazili su se mali klasteri neurona, nasumi no raspore ani, pa je zaklju eno da se radi o posebnoj "vrsti" neuronskih kola sa razli itim angažovanjem bilo uzlaznih, bilo lokalnih intramedularnih puteva, u zavisnosti od klasa ganglijskih elija koje se na njima projektuju. Zna i ganglijske elije odgovorne za prenos ose aja ukusa su heterogena populacija u smislu njihove povezanosti sa CNS, od kojih su neke ganglijske elije angažovane prvenstveno u uzlaznom "lemniscalnom" gustatornom putu, tj. neuronskom kolu koje je povezano s višim diskriminatornim i homeostatskim funkcijama, dok su druge angažovane "lokalno", u



intramedularnim “refleksnim” neuronskim kolima koji posreduju u gutanju i odbacivanju motornih oralnih funkcija (Zaidi *et al.*, 2008).

Na ganglijskim elijama GG mogu da se nalaze i brojni drugi receptori, osim receptora za neurotrofine, o čemu će biti više reči u narednom poglavlju o gustatornom sistemu. Među receptorima odgovornim za ukus, na neuronima GG nalaze se receptori za capsaicin, mentol i ulje slane. Ovi receptori pripadaju porodici receptora sa prolaznim receptorskim potencijalom (engl. Transient receptor potential, TRP). Capsaicin se vezuje za TRPV1, mentol za TRPM8 a ulje slane za TRPA1. Upotrebom PCR metode, TRPV1 mRNA i TRPA1 mRNA se jasno detektuju u neuronima GG, dok se TRPM8 mRNA detektuje u beznačajnoj koncentraciji. Upotrebom metode hibridizacije *in situ*, TRPV1 mRNA<sup>+</sup> ili TRPA1 mRNA<sup>+</sup> neuroni čine 15–20% neurona GG neurons, dok je samo nekoliko neurona TRPM8 mRNA<sup>+</sup>. Protein neurofilament 200 (NF200), marker mijelinizovanih nervnih vlakana tipa A, detektuje se u 57% neurona GG. Koekspresija TRPV1 mRNA ili TRPA1 mRNA sa NF200, prisutna je kod 10% neurona GG. Sugerisano je moguća uloga ovih receptora u somatosenzornim ili gustatornim funkcijama neurona GG (Katsura *et al.*, 2006).

Neurotransmisija iz elija gustatornih korpuskula do gustatornih neurona veoma je važna stepenica u nastanku osećaja ukusa. Receptorske elije za kiselo kada se depolarišu oslobađaju serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), i ove elije stvaraju sinapse sa perifernim gustatornim nervnim vlaknom, pa je sugerisano da je u slučaju receptorskih elija koje registruju kisele draži, serotonin neurotransmiter koji se oslobađa u sinaptičku pukorinu, a postsinaptička membrana je gustatorni neuron. Međutim, najnovija istraživanja su pokazala da gustatorni neuroni koji inervišu elije gustatornih ganglija koje registruju kisele draži veoma retko ekspimiraju gene za serotonin, pa postojanje serotonina kao neurotransmitera koji posreduje u prenosu kiselih draži na periferni neuron ganglijskih elija GG, ostaje nesigurno (Maeda *et al.*, 2016).

Štitina podešavanja gustatornih aferentnih neurona na ukusne draži veoma varira u zavisnosti od jačine stimulusa, o čemu će takođe biti više reči u narednom poglavlju, a više od 69% neurona reguluje na multiple draži (Wu *et al.*, 2015).

Što se tiče mogućnosti regeneracije neurona GG, eksperimentalne studije su pokazale da nakon oštećenja *chorda tympani* u neuronima GG dolazi do ekspresije aktivirajućeg transkripcionog faktora 3 (ATF-3), kao markera oštećenja neurona i GAP-43, kao markera regeneracije neurona. Takođe, zapažaju se atrofične promene i redukcija

protenskog genskoh produkta 9.5 u nervnim blaknima denervisanih jezi nih papila (*Tsuzuki et al., 2002*).

### **1.5.2. Submandibularni ganglion**

Submandibularni ganglion je mali vretenasti ganglion, smešten iznad dubokog dela submandibularne žlezde. Leži na m. hyoglossusu, u blizini zadnje ivice m. mylohyoideusa. Ganglion dobija dve grupe nervnih vlakana koja se odvajaju od n. lingualisa (grane n. mandibularisa, V3) – prednju i zadnju. Preko zadnje grupe on dobija vlakna iz *chordae tympani*, koja se pružaju zajedno sa n. *lingualisom* (kao njegov “omota”) (*Grey, 2010*).

### **1.5.3. Ganglion pterygopalatinum (Meckel)**

*Ganglion pterygopalatinum* (s. *ganglion sphenopalatinum*) je parasimpatiki ganglion smešten u *fossi pterygopalatini*. On u najvećem stepenu dobija vlakna od n. *petrosusa majora* (grane n. *facialisa* koja se odvajaju od njega u nivou *ganglion geniculi*). Postganglionska vlakna ovog ganglionia projektuju se u suznu žlezdu i sluznicu nosa i nepca (*Grey, 2010*).

## **1.6. Vaskularizacija n. facialisa**

Facijalni živac dobija inervaciju iz 4 krvna suda: 1) *a. cerebelli inferior anterior* (u pontocerebelarnom uglu), 2) labirintne arterije (grane *a. cerebelli inferior anterior*), 3) superficijalne petrozne arterije (grane *a. meningeae mediae*, koja ishranjuje *ganglion geniculi* i okolne strukture) i 4) stilomastoidne arterije (grane *a. auricularis posterior*; ova arterija ishranjuje živac i njegov deo distalno od *foramena stylomastoideuma*). Venska drenaža u nervu prati arterijsku vaskularizaciju (*Doži et al., 2015*). U vezi vaskularizacije n. *facialisa* i danas postoje kontroverze, pa je precizno proučavanje vaskularizacije facijalnog nerva, naročito u nivou *ganglion geniculi*, jedan od ciljeva proučavanja u ovoj doktorskoj disertaciji.

## **1.7. Patologija i klinički značaj ganglion geniculi**

Što se tiče kliničkog aspekta, *ganglion geniculi* može da bude mesto traumatskih lezija, infekcija, različitih patofizioloških poremećaja i neoplazmi njihovih promena (*Veillon et al., 2008*). Lezije ganglionia ili *nervusa intermediusa* mogu da nastanu zbog kranio cerebralne traume,

ukljujuju i eventualne prelome baze lobanje sa zahva enoš u piramide temporalne kosti (Helms, 1979).

U okviru **infekcija**, naj eš e je u pitanju virus *herpes simplex* (Arbusov et al., 1999; Vrabec et al., 2004), re e *herpes zoster* (Garcia Almargo et asl., 1977; Cimino et al., 1978; Furuta et al., 1992a,b), a izuzetno pile i *pox virusi* (Grose et al., 2002) ili bakterijska infekcija (). Nakon primarne infekcije, viremija diseminira virus po koži u predelu senzorne inervacije grana *n. facialis*. Virus se zatim transportuje duž senzornih vlakana *chordae tympani* do genikulatnog ganglion, gde može da bude godinama u latentnom stanju (Carreno et al., 2000). Virus se aktiviranjem ponovo transportuje duž nervnih vlakana, ali sada u suprotnom smeru, te uzrokuje nastanak vezikula i drugih promena na koži (Alvarez Santana et al., 1991). Izuzetno retko može da dodje do reaktivacije virusa *herpes zooster* u više ganglija (Heshemilar et al., 2009). Obolenje može da bude udruženo sa paralizom facijalisa i lezijom vestibulokohlearnog živca (Ramsey-Huntov sindrom) (Gellis et al., 1968).

Patofiziološki poreme aji odnose se prvenstveno na Belovu (Bell) paralizaciju facijalisa i na genikulatnu neuralgiju.

**Belova paraliza** je akutno neurološko obolenje koje se manifestuje perifernom paralizom *n. facialis*. Ponekad je zahva en i VIII kranijalni živac, što ini klini ki sliku spomenutog sindroma. Belova paraliza je idiopatskog karaktera, mada se pretpostavlja da je u pitanju herpesna virusna infekcija (ili reaktivacija latentnog virusa u genikulatnom ganglionu) a možda je i re o autoimunom procesu. U ovom drugom slu aju stvaraju se antitela protiv komponenti mijelinskog omota a aksona facijalnog živca. Pretretman sa antiherpeti nim lekovima i steroidima smanjuje mogućnost za nastanak pozne Belove paralize nakon otološkog hirurškog zahvata (Thompson-Turner et al., 2014). U patološkom nalazu postoje edem živca, ishemija u uzanom koštanom kanalu i parcijalna demijelinizacija sa posledni m gubitkom funkcije živca. Oporavak funkcije posle medikamentozne terapije (kortikosteroidima i aciklovirom) zapaža se u oko 80% pacijenata. Ponekad je potrebna intervencija u vidu transmastoidne dekompresije facijalisa (Kim et al., 2007).

**Genikulatna neuralgija**, koja se naziva još i „*tic douloureux of the nervus intermedius*“, odnosi se na pojavu jakog paroksizmalnog bola fokusiranog u predelu uha, zbog ega se svrstava u primarne otalgije. Na ublažavanje bola ne uti u klasi ni analgetici, ve pojedini antiepilepti ki lekovi. Patofiziološki mehanizam ove neuralgije zasniva se na fokalnoj segmentnoj demijelinizaciji pojedinih aksona *n. intermediusa* i abnormalnog transferzalnog prenošenja depolarizacije sa jednog na drugi ogoljeni akson. Ipak, u mehanizam neuralgije ukljuju eni su i neuroni *ganglion geniculi* (Tubbs et al., 2013).

Naj eš i uzrok fokalne demijelinizacije jeste kompresija *n. intermediusa* blizu njegovog izlaska iz moždanog stabla. Kompresiju naj eš e vrši vaskularna om a *a. cerebelli inferior anterior*, a re e *a. cerebelli inferior posterior*. Na tome se zasniva i glavni neurohirusrši zahvat – mikrovaskularna dekompresija *n. inremediusa*. U slu ajevima bez vaskularne kompresije, naj eš e se vrši presecanje ovog živca, a ponekad se izvodi i resekcija genikulatnog ganglionu. Pristupni putevi za ove intervencije jesu retromastoidna kraniotomija, subtemporalni put preko srednje lobanjske jame i transmastoidni ekstralabirintni ili translalabirintni pristup.

Najzad, u genikulatnom ganglionu i njegovoj okolini mogu da nastanu **tumori i sli ne patološke formacije** (*Gonzales Garcia et al., 2004*). Mada retko, pojavljuju se meningiom (*Falcioni et al., 2001*), a mnogo re e holesteatom (). U retke tumefakte spadaju i švanomi (*Hahn et al., 2003*), i naro ito, neurofibromi (). Nešto eš e se pojavljuju hemangiomi i sli ni vaskularni tumori ili malformacije (*Isaacson et al., 2005; Capelle et al., 2008*). Što se ti e *n. intermedius*, u nivou njegovog cisternalnog i meatusnog segmenta, naj eš e nastaju neuromi, tj. švanomi vestibularnog živca koji vrše kompresiju *n. intermediusa*.

Sve ve i zna aj genikulatnog ganglionu i labirintnog segmenta facijalnog živca u klini koj medicini, zahtevao je i vizuelizaciju tog minijaturnog ganglionu i malih patoloških procesa u njegovom nivou. U tome se nedavno uspelo u okviru komjuterizovane tomografije visoke rezolucije i naro ito, kombinovanjem odgovaraju ih parametara u okviru magnetne rezonance (*Veillon et al., 2008; Fabiano et al., 2010; Tubbs et al., 2013*).

## **1.8. Gustatorni sistem i molekularni mehanizni prepoznavanja ukusa**

### **1.8.1. Gustatorni korpuskuli – ulo ukusa**

Gustatorni korpuskuli su telašca uronjena u oralni epitel. Njih izgra uje 50 – 100 polarizovanih neuroepitelnih elija, organizovanih u vidu ostrvaca cilindri nog pseudoslojevitog epitela. Kod oveka u usnoj duplji i okolnim zonama ima po gruboj proceni oko 2.000 do 5.000 gustatornih korpuskula, raspore anih u jeziku, mekom nepcu, epiglotisu, faringsu i laringsu. Gustatorni korpuskuli nalaze se u najve em broju u jeziku, u opšan enim (*papillae circumvallatae*), pe urkastim (*papillae fungiformes*) i listastim papilama (*papillae foliatae*). U zadnjem delu jezika, u opšan enim papilama, nalazi se oko 40% gustatornih korpuskula jezika i oni su inervisani s *n. glosopharyngeus*. Oko 30% svih gustatornih korpuskula jezika smešteno je u prednjem delu jezika u pe urkastim papilama i ti korpuskuli inervisani su s *chorda tympani*. Kona no, u listastim papilama smešteno je preostalih 30%

gustatornih korpuskula jezika i njihova inervacija potječe od *chorda tympani* i *n. glossopharyngeus*. Gustatorni korpuskuli smešteni u mekom nepcu inervisani su s *n. petrosus major*, a oni smešteni u epiglotisu, faringsu i laringsu sa *n. vagus* (Fabian et al., 2015).

Ukusni signali iz receptora gustatornih elija koje izgrađuju gustatorne korpuskule, prenose se preko perifernih procesusa unipolarnih nervnih elija u genikulatni ganglion facijalnog živca (ulazi u jezik preko *chorda tympani* i *n. lingualis*), u *ganglion inferior n. glossopharyngei* i *ganglion inferior n. vagi* (Grey, 2010). Preko tih elija i njihovih centralnih procesusa, impulsi dolaze do delova gustatornog aparata koji se nalazi u CNS, a koji uključuju *tractus solitarius*, *nucleus tractus solitarius* i njegove ascendentne veze, uključuju i *nucleus ventralis posterior medialis thalami*, antero-inferiorni dio senzomotornog korteksa i *insulu*, kao i nekoliko drugih veza s brojnim jedrima hipotalamusa i limbičkog sistema (Williams and Warwick, 1980). Relejna (prenosna) vlakna svakako dospevaju do frontalnog korteksa.

Iako gustatorni korpuskuli u svim regijama reaguju na slatko, slano, kiselo, gorko i umami, postoje razlike u njihovoj osetljivosti na ukusne draži. Smatra se da su te razlike odraz raspodele različitih gustatornih elija od regije do regije (Roper, 2013), kao i da potječu od razlike u osetljivosti na ukusne draži gustatornih elija prisutnih u različitim regijama (Yasuo et al., 2008). Na osnovu morfologije, razlikuju se tri fenotipa gustatornih elija: tip I, II i III elije, koje se nazivaju i tamne, svetle i intermedijarne elije (Farbman, 1965). Potrebno je istaći i da morfološke razlike koreliraju s funkcionalnim razlikama između ova tri tipa elija (Iwatsuki and Uneyama, 2012). Iako su mnogi autori ranije smatrali da su sve ove elije „elije receptora ukusa“, sada je jasno da su otprilike polovina ili manje od toga ovih elija zapravo samo receptori (Chaundhari, 2014). Osim elija tipa I, II i III, u gustatornim korpuskulima postoje i bazalne elije (koje se po nekim literaturnim podacima označavaju i kao elije tipa IV), koje ne šalju svoj produžetak u *porus gustatorius*. Radi se o nepolariziranim, verovatno nediferenciranim elijama ili nezrelim receptorskim elijama, iji pravi značaj tek treba da se utvrdi (Chaundhari and Roper, 2010).

I pored toga što su elije tipa I najbrojnije, njihova funkcija nije u potpunosti okarakterisana. Smatra se da je njihova osnovna funkcija održavanje strukture gustatornih korpuskula, kao i eliminacija sinaptičke transmisije i ograničavanje širenja transmitera (slično ulogu koju u CNS imaju glija elije), pa se nazivaju i „glija elije“ gustatornih korpuskula (Chaundhari and Roper, 2010, Chaundhari, 2014). U poslednje vreme spominje se i moguća uloga elija tipa I kao sedišta receptora za ukus slanog (Breza and Contreras, 2012), međutim, ostaje nejasno da li te elije imaju ulogu u detekciji nadražaja i / ili u njihovoj

modulaciji. elije tipa II poseduju receptore vezane za G protein (engl. G protein-coupled receptors, GPCRs) i odgovorne su za reakciju na slatke i gorke supstance, kao i na umami (Vegezzi, 2014), pa se smatra da postoje najmanje tri podvrste ovih elija koje reagiraju na svaki od navedenih nadražaja (Ieatsuki and Uneyama, 2012). Vrlo je verovatno da su elije tipa II tako e uklju ene i u stvaranju ose aja slanog ukusa na nespecific an na in (Chaundari and Proper, 2010). Me utim, ultrastrukturnim istraživanjima je utvr eno da elije tipa II ne stvaraju sinapse sa naspramnim nervnim vlaknima (verovatno eferentnim gustatornim vlaknima), pa prema tome prenos signala ukusa iz ovih elija na aferentna senzorna vlakna mora se bazirati na jedinstvenom, još neokarakterisanom mehanizmu prenosa. Za razliku od ovih nalaza, postoje neosporni dokazi da elije tipa III ekspimiraju proteine karakteristi ne za podru je sinapse, kao i da zaista stvaraju sinapse sa gustatornim aferentnim nervnim završecima (Chaundari and Proper, 2010). elije tipa III registruju gorke nadražaje (Huang et al., 2006), ali njihova važna funkcija je i da primaju i integrišu signale iz elija tipa II pa u suištini mogu da reaguju na širok spektar ukusnih draži (Chaundari and Proper, 2010). Iz izloženog može da se zaklju i da, iako se pretpostavlja uloga elija tipa II i I u prijemu slanih nadražaja, još uvijek se ne zna precizno koje su elije gustatornih korpuskula zaista odgovorne za ukus slanog (Roper, 2013), dok elije tipa III svakako imaju presudnu ulogu u prijemu, integraciji i moduliranju ostalih ukusnih draži.

Veoma je interesantno da se elije koje ekspimiraju receptore za slatke / umami (receptori T1R) i / ili gorke (receptori T2R) i / ili kisele draži (npr. receptori ASIC) i njihove signalne molekule, nalaze i na mestima van usne duplje, poput digestivnog trakta (Breza et al., 2012; Karkashivili et al., 2014) (uklju uju i želudac, crevo, pankreas i jetru), respiratornog trakta, urogenitalnog i reproduktivnog sistema (Li, 2014) i mozga. Nedavno je funkcionalni umami-receptor (T1R1/T1R3) prona en i u neutrofilima. Ovi podaci podupiru hipotezu po kojoj su hemosenzorni mehanizmi konzervirani u celom digestivnom traktu [43], a tako e snažno podupiru koncept da elije koje poseduju receptore za ukusne draži mogu vršiti i odre ene “ne-ukusne” funkcije, koje mogu da budu razli ite, u zavisnosti od njihove ekstraoralne lokalizacije (Fabian et al., 2015).

### **1.8.2. Receptori ula ukusa**

U principu, slatko, slano, kiselo, gorko i umami smatraju se osnovnim vrstama ukusa. Receptori za ovih pet osnovnih ukusnih draži podeljeni su u dve osnovne grupe: GPCRs i receptori tipa jonskih kanala (Niki et al., 2010). Ekspresija receptora ukusa na elijama gustatornih korpuskula pokazuje da je svaka vrsta ukusa kodirana zasebnom populacijom

elija, a te odvojene populacije elija reaguju samo s jednim od pet osnovnih ukusnih draži. Dakle, kvalitet ukusa diskriminiše se prvenstveno na nivou gustatornih elija (Niki et al., 2010). Aktivacija gustatornih elija dovodi do otpuštanja transmitera i aktivacije gustatornih nervnih vlakana. Karakteristike odgovora različitih gustatornih elija i s njima povezanih gustatornih senzornih aferentnih vlakana su vrlo slične, međutim, vrlo je verovatno da gustatorna vlakna selektivno inervišu odgovarajuće vrste gustatornih elija (Yoshida and Ninomiya, 2010).

Zanimljivo je da je samo mali broj gustatornih elija ima sinaptičke kontakte sa gustatornim nervnim vlaknima (Seta and Toyoshima, 1995). elije koje eksprimiraju receptore za kisele draži (receptori PKD2L1) prenose ove nadražaje putem sinapsi u kojima se kao neurotransmiter oslobađa serotonin (Niki et al., 2010). Za razliku od toga, kao što je već istaknuto, gustatorne elije koje eksprimiraju receptore za slatko, gorko i umami, ne poseduju konvencionalne sinaptičke strukture, iako imaju bliski kontakt sa senzornim nervnim vlaknima, a neurotransmiter u transmisiji ukusnih nadražaja sa ovih elija je adenzin 5'-trifosfat (ATP) (Murata et al., 2010). Mehanizam kojim se prenose slane draži sa gustatornih elija na gustatorna nervna vlakna još nije poznat.

Iako većina gustatornih elija (60% -70%) reaguje isključivo na jednu od osnovnih vrsta ukusnih nadražaja, kako je već istaknuto kao opšte pravilo, još uvijek postoji značajan broj gustatornih elija koje reaguju na više vrsta ukusa, pa te elije mogu da doprinesu diskriminaciji više malih razlika između gustatornih supstanci (Niki et al., 2010).

Receptori za ukus slatkog i umami pripadaju porodici T1R receptora (T1R1, T1R2 i T1R3), koja je članica šire porodice receptora koji se kupliraju na G-protein (GPCR) (Niki et al., 2010). Receptori T1R su heterodimerni receptorski kompleksi: receptori za slatko su heterodimeri T1R2/T1R3, a za umami heterodimeri T1R1/T1R3 (Nelson et al., 2002). Heterodimeri T1R2/T1R3 aktiviraju se različitim zaslađivačima (šećerima, vešta kim zaslađivačima, slatkim aminokiselinama i slatkim proteinima), dok se heterodimeri T1R1/T1R3 aktiviraju prvenstveno mononatrijum-glutamatom (MNG) kod ljudi (Ikada, 1909) i aminokiselinama kod životinja (miševa) (Li et al., 2002). Iako se MNG smatra prototipom umami ukusa kod ljudi, umami mogu da izazovu i neke druge aminokiseline (npr. aspartati), kao i veliki broj malih peptida, neke organske kiseline (npr. mlečna, lizibarna i propionska kiselina), kao i druge materije, kao što su monofosfatni estri guanozin ili inozin nukleotida (IMP i GMP) (Lindenmann et al., 2002),

Postoje i drugi receptori kojima se registruje osećaj umami, a koji nisu dimeri T1R1/T1R3. To su na primer, receptori mGluR1 i 4, koji se eksprimiraju u gustatornim

elijama. Radi se o varijantama metabotropnih glutamatnih receptora 1 i 4, koje u stvari oknjene N-terminalne sekvence receptora na koje se glutamat još uvek vezuje, ali sa smanjenim afinitetom u pore enju sa kompletnim receptorima koji se eksprimiraju u mozgu (*Yasuo et al., 2008*). Mogu e je da je skra enje receptora adaptacija na višu koncentraciju glutamata u hrani, u pore enju na koncentracijom u mozgu (*Lindenmann et al., 2008*). Nedavne studije su pokazale da se osjetljivost gustatornih elija na slatke draži može modulirati putem hormona i drugih endogenih inilaca, tako e direktnim vezivanjem za odgovaraju e receptore na gustatornim elijama (*Jyotaki et al., 2010*),. Tako hormon leptin (koji smanjuje unos hrane putem aktivacije hipotalamusnih receptora) selektivno smanjuje ukus slatkog preko leptinskog receptora (Ob-DB) na gustatornim elijama. Isto tako, endokanabinoidi (koji podsti u unos hrane putem kanabinoidnih receptora eksprimiranih uglavnom u hipotalamusu) poboljšavaju ose aj slatkog preko CB1-receptora na gustatornim elijama (*Niki et al., 2010*).

Gorki ukus se registruje preko familije receptora T2R, koja tako e pripada široj familiji GPCR (familiji A) (*Niki et al., 2010*). Kod ljudi je ustanovljeno 25 lanova familije receptora T2R koji mogu da funkcionišu kao receptori za ukus gorkog (*Clark et al., 2012*). Odre eni T2R mogu biti tako široko “podešeni” da ih aktiviraju hemijski razli ite gorke materije, dok su drugi više diskretno ili usko “podešeni” tako da prepoznaju samo pojedina na jedinjenja ili nekoliko jedinjenja (*Clark et al., 2010*). Iako ose aj gorkog može da izazove nekoliko desetina hiljada sintetskih i prirodnih jedinjenja (*Clark et al., 2010*), ligandi za neke od receptora T2R (kao što su T2R41, T2R42, T2R45, T2R48, T2R60) još uvek su nepoznati. injenica da se T2Rs koeksprimiraju sa drugim receptorima u subpopulaciji gustatornih elija, ukazuje na mogu nost da T2Rs mogu da stvaraju heterooligomere, sli no kao i T1Rs. Me utim, funkcionalni zna aj oligomerizacije nije još razjašnjen (*Behrens et al., 2007; Kuhn et al., 2010*).

Slatke, umami i gorke nadražaje primaju razli iti GPCRs, ali nakon aktivacije tih receptora koristi se zajedni ki signalni put (*Niki et al., 2010*): materije odgovorne za slatko, umami i gorko, vezuju se za odgovaraju e receptore i aktiviraju heterotrimerni G-protein (subjedinica alfa-gustducin, transducin) fosfolipazu C 2 (PLC 2) inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) Ca<sup>2+</sup> signalizaciju (*Suzuki et al., 2007; Yasuo et al., 2008*). Oslobo en Ca<sup>2+</sup> podsti e prolazni receptorski potencijal kanala M5 (engl. Transient receptor potential channel M5, TRPM5) što dovodi do depolarizacije gustatorne elije i stvaranja akcionog potencijala pomo u naponskih natrijumovih kanala (engl. Voltage-gated sodium channels, VGSC). Generisanje akcionog potencijala dovodi do otpuštanja ATP, kroz kanale zavisne od



membranske depolarizacije, što se detektuje pomoću u receptora na aksonima koji prenose informacije od gustatornih elija do mozga (*Yasuo et al., 2007; Chandra, 2014*).

Ukus kiselog i slanog posredovan je receptorima tipa jonskih kanala. Kiseli ukus je injiciran protonima i zavisi od pH (*DeSimone et al., 2006*), jer je, na primjer, sir etna kiselina jača nego HCl u izazovanju ukusa kiselog. Jonski kanali koji su potencijalno odgovorni za osećaj kiselog su: jonski kanali osetljivi na kiseline (engl. Acid-sensing ion channels, ASICs) (*Ugawa et al., 2003*), hiperpolarizacijom aktivirani ciklički nukleotid-kalijumovi kanali (engl. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channels, HCNs), kalijumovi kanali (*Lin et al., 2004*), NPPB- senzitivni hlorni kanali (engl. 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB)-sensitive Cl<sup>-</sup>channels) (*Miyamoto et al., 1998*), PKD1L3/PKD2L1 jonski kanali (engl. Polycystic kidney disease 1L3 and 2L1 heterodimer ion channels) (*Ishimaru et al., 2006*). Najozbiljniji kandidati za receptore za osećaj kiselog od navedenih jonskih kanala su PKD1L3 / PKD2L1 i ASICs (*Huque et al., 2009*), ali njihova uloga u stvaranju ukusa kiselog tek će biti razjašnjena u budućim istraživanjima.

U slučaju ukusa slanog, smatra se da su epitelni natrijumovi kanali (ENaC) primarni i specifični receptori, jer amilorid, blokator epitelnih natrijumovih kanala, smanjuje drastično odgovor na NaCl gustatornih elija i neurona, kao i bihevioralni odgovor (*Niki et al., 2010*). Nadalje, podaci upućuju na postojanje bar još jednog receptora za slane draži koji je neosetljiv na amilorid, a reaguje sa različitim katjonima – Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> (*DeSimone and Lyall, 2006*). Ovaj receptor je drugačiji od ENaC, i verovatno se eksprimira na različitim tipovima gustatornih elija (*Chandrashekar et al., 2010*). Postoji još jedan potencijalni receptor za osećaj slanog, koji spada u amilorid-neosjetljive ne Na<sup>+</sup>-kanale – receptor TRPV1 (engl. Transient receptor potential (TRP)-type nonselective cation channel-coupled vanilloid receptor-1) (*DeSimone and Lyall, 2006*).

U slučaju gustatornih elija koje reguju na kisele i slane materije, prenos signala nastaje pomoću aktivacije jonskih kanala koja indukuje depolarizaciju elija, što dovodi do stvaranja akcionog potencijala pomoću naponskih natrijumovih kanala (VGSC) u ovim elijama (*Niki et al., 2010*). Generisanjem akcionog potencijala dolazi do otpuštanja signalnih molekula, koji još uvek nisu okarakterisani (moguće je da su to ATP ili serotonin), iz ovih elija, a putem kojih se signal detektovan u gustatornim elijama prenosi duž aksona do mozga (*Chaudhari and Reper, 2010; Chaudhari, 2014*).

Pored navedenih receptora za pet osnovnih vrsta ukusa, postoje i receptori putem kojih se registruju i drugi modaliteti ukusa, kao što su „masni ukus“ ili „ukus masnih

kiselina“, „ukus CO<sub>2</sub>“ i ukus oporog (*Chandrashekar et al., 2009; Dinnella et al., 2010*). Me utim, mehanizmi i putevi prenosa ovih modaliteta ukusa nisu razjašnjeni.

### **1.8.3. Pljuva ka i ose aj ukusa**

Gustatorni sistem ima važnu ulogu u odreivanju toga koju hranu preferiramo i unosimo, kao i u održavanju nutritivne, energetske i elektrolitne ravnoteže. Na žalost, nisu poznati upotpunosti precizni mehanizmi fine regulacije ose aja ukusa, ali sasvim je jasno da u toj regulaciji važnu ulogu imaju pljuva ka, crevni hormoni i hormoni koji odreuju apetit (kao što su leptin, grelin, insulin, neuropeptid Y, peptid YY i drugi) (*Fabian et al., 2015*).

Iako je predloženo pre gotovo sto godina da sastav pljuva ke može biti odgovorna za razlike me u ljudima u pogledu ukusa (*Fox, 1932*), ta an mehanizam o tome koliko pljuva ka i njen sastav ima uticaja na fino “podešavanje” ose aja okusa i dalje je neistraženo i izazovno podru je ispitivanja. Dosadašnja istraživanja su pokazala da važnu ulogu u modulaciji ukusa pored ve spomenutih hormona-metaboli kih polipeptida koji se nalaze u pljuva ki (leptin, grelin, insulin, NPY, PYY i drugi), imaju i drugi proteini pljuva ke – ugljeni na-anhidraza (gustin), proteini bogati prolinom, cistatini, alfa-amilaza (ptijalin), histatini, albumini i mucini pljuva ke, glukagonu-sli an peptid 1 (engl. Glucagon-like peptide 1, GLP-1), IgA, zink- $\alpha$ -2-glikoprotein, laktopeptidaza pljuva ke, prolaktin-inducibilni protein pljuva ke, protein toplotnog stresa 70 (engl. Heat shock proteine 70, HSP70) i drugi. Neke fizi ko-hemijske osobine pljuva ke tako e su zna ajne u nastanku gustatornih senzacija – brzina protoka pljuva ke, puferski kapacitet i njen jonski sastav (*Fabian et al., 2015*).

## **1.9. Neuropeptidi, neurotransmiteri i *ganglion geniculi***

Neuropeptidi su važni posrednici kako unutar nervnog sistema, tako i izme u neurona i drugih vrsta elija. Tako npr. neuropeptidi, kao što su supstanca P (SP), peptid kodiran genom za kalcitonin (engl. Calcitonin gene-related peptide, CGRP), neuropeptid Y (NPY), vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), somatostatin, faktor otpuštanja kortikotropina (engl. Corticotropine releasing factor, CRF) i sl. igraju ulogu u dvosmernoj komunikaciji u okviru osovine crevo-mozak, dok isti ili neki drugi igraju ulogu u komunikacijama koje se ostvaruju u okviru neuroendokrine osovine, neuroendokrinoimunološke osovine i sli no.

Naki radovi, naro ito na životinjama, pokazali su da se SP i CGRP sintetišu u ganglijskim elijama GG, sa još nedovoljno ispitanom ulogom, i bez dovoljno podataka na

uzorcima kod ljudi (*Koga et al, 2000*). Zato je značaj rezultata dobijenih ispitivanjima obuhvaćen ovom disertacijom značajan.

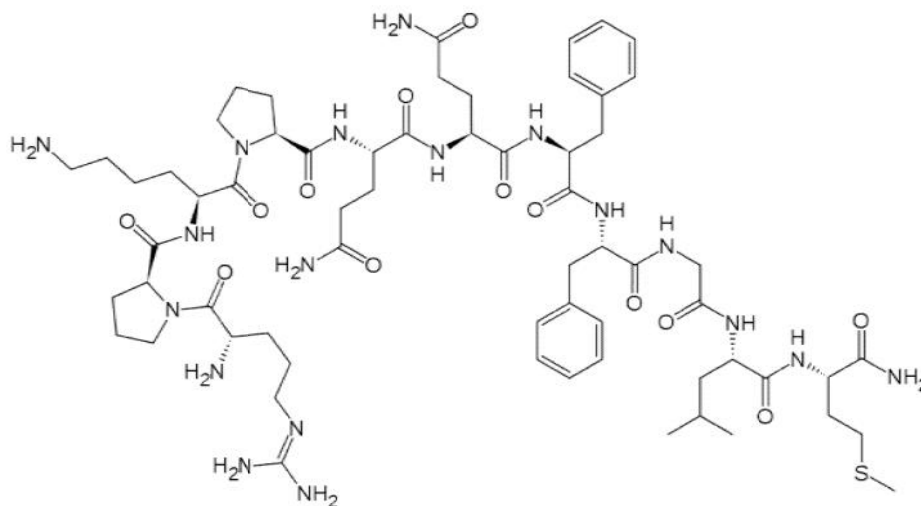
### 1.9.1. Supstanca P (SP)

U senzornim spinalnim i senzornim ganglijama kranijalnih nerava nalaze se neuroni koji imaju senzornu funkciju. Somatski senzorni neuroni u senzornim ganglijama zadnjeg korena spinalnog nerva (engl. Dorsal Root Ganglia, DRG) sastavljeni su od različitih senzornih receptora, kao što su nociceptori, pruriceptori, termoreceptori i mehanoreceptori (*Basbaum et al. 2009; Delmas et al., 2011*). Većina, ako ne i svi neuroni DRG su glutaminički ili ekscitatorni neuroni i oslobađaju glutamat na postsinaptičke neurone zadnjeg roga kičmene moždine. Međutim, određena populacija neurona DRG dodatno oslobađa neuropeptidne transmitere. Naime, smatra se da postoje dva podtipa neurona uključujući njih u prenos bola, svraba i termalnih nadražaja – peptidni i ne-peptidni. Peptidni neuroni oslobađaju dva klase neuropeptida – SP i CGRP, dok većina ne-peptidnih neurona vezuje selektivno B4 (IB4) (*Basbaum et al., 2009*). Ova klasifikacija nije u potpunosti precizna, s obzirom da su u navedene procese uključeni i drugi neuropeptidi. Tako npr. kada je peptid koji oslobađa gastrin (engl. Gastrin-Releasing Peptide, GRP) eksprimiran u hipotetičkim CGRP<sup>+</sup> pruriceptorima, tada se neuromedin B (NMB) eksplicira i u CGRP<sup>+</sup> i u IB4<sup>+</sup> neuronima (*Ma, 2014*).

Supstanca P (SP) je prvi otkriveni neuropeptid iz porodice tahikinina, pa je stoga nazvan “pionirski neuropeptid”. Generalno, ona se oslobađa iz terminala specifičnih senzornih nerava, a nalazi se i u neuronima kičmene moždine i mozga, kao i u stanicama imunološkog sistema i mnogih drugih organskih sistema tela. Funkcija ovog neuropeptida primarno je povezana sa nastankom bola i razvojem neurogene inflamacije, kao i sa brojnim drugim patološkim stanjima, pa se spisak kontinuirano uvećava.

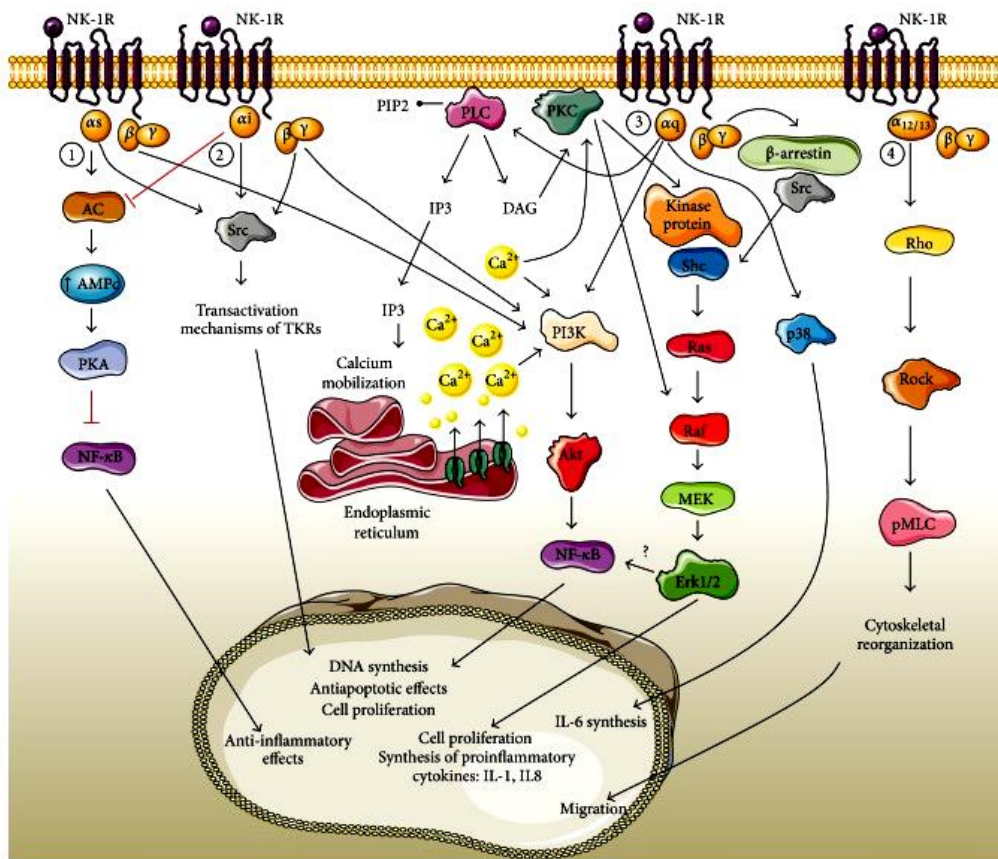
Naučnici Ulf von Euler i John Gaddum su 1931. godine pokazali da tkivni ekstrakt mozga i creva konja izaziva kontrakciju creva u uslovima *in vitro* (*Euler and Gaddum, 1931*). Tkivna distribucija i biološka aktivnost SP potom je intenzivno proučavana u sledećim decenijama (*Harrison et al., 2001*). Struktura peptida je otkrivena 1971. godine od strane Susan Leeman i tada je pokazano da SP ima 11 aminokiselinskih rezidua. Kasnije je iz kičmene moždine svinje, 1983. godine (*Panula et al., 1983*) otkriven neurokinin A (NKA), koji je poznat i pod starim nazivom kao supstanca K ili neuromedin L, drugi važan član tahikininske porodice peptida, analog SP. Otkriće SP ne samo da je pružilo mnoge informacije o neuropeptidima, već je omogućilo da se, zahvaljujući njegovoj aktivnosti istovremeno

dokazanoj u ekstraktu mozga konja i ekstraktu creva sa efektima na kontraktilnost creva i krvni pritisak, identifikuje prvi od mnogih neuropeptida iz osovine mozak-crevo. Ovi peptidi istovremeno se sintetišu i oslobađaju u neuronima enteričkog nervnog sistema, enteroendokrinim ćelijama i neuronima mozga.



Slika 1.10. Struktura SP.

Struktura SP prikazana je na slici 1.10. Redosled aminiokiselina u polipeptidnom lancu SP je sledeći – Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met, sa amidacijom C-terminalnog kraja. SP, neurokinin A (NKA) i neurokinin B (NKB) su reprezentativni peptidi tahikininske familije kod sisara. SP je član velike familije peptida – tahikinina, čiju sintezu kodiraju tri *Tac* (od *Tachikinin*) gena. Tahikini se vezuju za svoja tri neurokininska receptora (NKRs) čiju sintezu kodiraju tri *Tacr* gena. S obzirom da je otkrivena struktura, funkcije i mehanizma prenosa ćelijskih signala putem ovih receptora bilo smernica i utroput ispitivanju drugih receptora iz familije receptora koji se kupuju na G-protein (GPCRs), NKRs takođe su dobili naziv “pionirski receptori.” Endogeni receptor SP je neurokinin-1 receptor (NK1R) i, kao što je već istaknuto, član je familije GPCRs. Međutim, dokazano je da SP reaguje i sa drugim neurokininskim receptorima. Aminokiselinske rezidue receptora, sposobne za vezivanje za SP i njene antagoniste, nalaze se u ekstracelularnoj petlji transmembranskog regiona NK-1R. Vezivanje SP za NK1R dovodi do internalizacije putem mehanizma zavisnog od klatrina, koji acidifikuje endosome kada dođe do disocijacije kompleksa SR-receptor. Kasnije se SP degradira, a NK1R se ponovo re-eksprimira na ćelijskoj membrani. Mehanizmi prenosa ćelijskih signala podstaknutih vezivanjem SP za NK1R prikazan je na slici 1.11 (*Garcia-Recio and Gascón, 2015*).



Slika 1.11. Neki od mogućih signalnih puteva nastalih aktivacijom NK1-R.\*

(1) G<sub>s</sub> aktivacija AC katalizuje ATP do cAMP, koji se sa svoje strane vezuje za regulatornu subjedinicu cAMP-zavisne PKA. Obično PKA fosforiliše CREB transkripcijski faktor. CREB se vezuje za cAMP response element (CRE) ciljnog gena i negativnim efektima aktivira NF-κB. (2) Inhibicija AC vrši se pomoću G<sub>i</sub> proteina senzitivnog na *Pertussis toxin*. Šta više, G<sub>i</sub> i G<sub>s</sub> subjedinice pojačavaju aktivaciju Erk1/2 nakon transkripcije Src proteina posredovane sa EGFR.

(3) Vezivanjem SP za receptor, trigeruje se pretvaranje GDP iz GTP na G<sub>q</sub> subjedinici, pa dolazi do disocijacije G<sub>q</sub> iz G<sub>i</sub> i kao posledica toga nastaje nishodna aktivacija efektor, kao što je PLC. Ovaj enzim katalizuje konverziju PIP<sub>2</sub> u sekundarni glasnik IP<sub>3</sub> i DAG, stimulišu i pri tome mobilizaciju kalcijuma i aktivaciju PKC. Preko ne-receptorskih protein-kinaza, kao što su Src ili Pyk2, PKC može da aktivira put MAPK, ali može da aktivira i Raf-protein direktno. Drugi paralelni mehanizam koji reguliše MAPK može da nastane u toku internalizacije NK-1R. Iako je mehanizam nepoznat, protein Erk1/2 takođe je uključen u aktivaciju NF-κB. Ta subjedinica G<sub>q</sub> subunit takođe posreduje u produkciji IL-6 aktivacijom p38 MAPK.

(4) Subjedinica G<sub>12/13</sub> odgovorna je za aktivaciju Rho/Rock koji direktno regulišu fosforilaciju lakih lanaca miozina (MLC). Fosforilacija ovih proteina povezana je sa citoskeletnom reorganizacijom i ćelijskom migracijom. Dimer β-arrestin aktivira proteine kao što su Src, PI3K i PLC. Ova slika napravljena je u *Servier Medical Art collection* (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>).

\*Garcia-Recio and Gascón, *Biomed Res Int*. 2015;2015:495704.

Supstanca P i NK1R su široko rasprostranjeni u mozgu, a nalaze se u moždanim regijama koje su specifične za regulaciju emocija (hipotalamus, amigdala i siva masa oko akveduktusa). Nalaze se u bliskom odnosu sa serotoninским neuronima i neuronima koji sadrže norepinefrin, a koji su zajedno najaktuelnija ciljna grupa neurona prilikom upotrebe antidepressiva. Promotor SP receptora sadrži regije koje su osjetljive na cAMP-a, AP-1, AP-4 CEBPB i epidermalni faktor rasta (EGF). Budući da su te regije vezane za kompleksne puteve prenosa signala posredovanih citokinima, predloženo je da citokini i neurotrofi ni faktori mogu stimulirati NK1R. Također, SP može indukovati citokine koji su sposobni da indukuju NK1-transkripcijski faktor (*Kovács et al., 2006*). Nakon vezanja za NK1R, SP regulira mnoge patofiziološke funkcije centralnog nervnog sistema, kao što su emocionalno ponašanje, stres, depresija, anksioznost, afektivno ponašanje, povraćanje, migrena, alkoholna zavisnost, epilepsija i neurodegeneracija.

Neurogena inflamacija može da ima ulogu u sekundarnim oštećenjima nastalim kao odgovor na akutne povrede CNS-a, uključujući i traumatsku povredu mozga (TPM) i moždani udar. U tome je ključno otpuštanje SP, za koju se pokazalo da se povećano sekretuje kod akutnih povreda CNS, a količina sekretovane SP u direktnoj je korelaciji sa učestalošću i veličinom infarkta. Otpuštanje SP povezano se sa povećanom propusnošću u krvno-moždane barijere i razvojem vazogenog edema, kao i oštećenjem nervnih vlakana i drugim funkcionalnim ishodom. Pokazano je da je inhibicija djelovanja SP upotrebom NK1RA vrlo korisna kod fokalnog i difuznog modela TPM, kao i ishemijske apopleksije, s terapijskim prozorom do 12 sati. Na osnovu takvih eksperimentalnih rezultata, predlaže se mogućnost upotrebe NK1RA kao novog terapijskog modaliteta u liječenju zapaljenja nakon akutne povrede CNS (*Corrigan et al., 2016*).

Tahikininini učestvuju u važnim fiziološkim i patološkim procesima i u gastrointestinalnom, respiratornom, urogenitalnom traktu, jetri, plućima, placenti, koži, kardiovaskularnom sistemu. SP se nalazi u svim telesnim tečnostima, kao što su krv, cerebrospinalni likvor, mleko. Pokazano da sistem NK1-signalizacije u hipotalamusu igra ključnu ulogu u regulaciji lučenja gonadotropina i nastanka puberteta. Smatra se da NK1 sistem može da ima važnu profilaktičku ulogu kod poremećaja kretanja (*Onaga et al., 2014*).

Studije su pokazale preklapanje distribucije TAC1- i TAC3-transkriptata u infundibulumu hipofize, a obe mRNA povećavaju se značajno nakon menopauze. Također, SP-IR neuroni registrovani su u regiji infundibuluma hipofize (*Hrabovszky et al., 2013*), a broj i intenzitet bojanja SP-IR perikariona neurona značajno je viši kod žena u postmenopauzi nego kod muškaraca iste životne dobi. Također, pokazano je da postoji

zna ajno preklapanje u raspodeli SP-IR, NKB-IR i KP (kisspeptin)-IR kod žena u postmenopauzi, kao i da je SP-IR prisutna u velikim podskupovima KP-IR i NKB-IR neurona: 31% KP-IR i 25% NKB-IR perikariona neurona sadržalo SP, dok je 16,5% svih obeleženih neurona pokazivalo trostruki imunofenotip. Pprisustvo dvostruko i trostruko obeleženih vlakana u infundibulumu hipofize, otvara mogućnost da su se ti peptidi zajedno otpustili u portalnu cirkulaciju. Štaviše, neki od tih aksona ostvaruju povremene kontakte sa hipofizeotropnim GnRH-IR vlakanima u postinfundibularnoj eminenciji, infundibulumu i neurohipofizi (*Hrabovszky et al., 2013; Borsay et al., 2014*). Ti topografski anatomske nalazi ukazuju da SP može modulisati i dejstvo KP i NKB putem autokrinih / parakrinih mehanizama i / ili da preko dejstva na hipofizeotropne GnRH- aksone može neposredno da reguliše otpuštanje GnRH (*Roh et al., 2015, Scapits et al., 2015*).

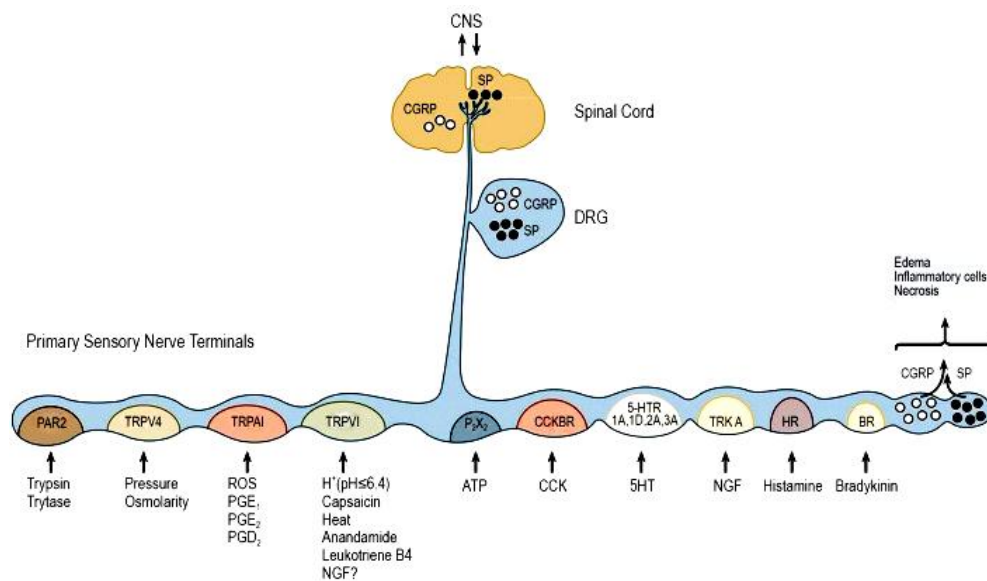
Bolesnici s ulceroznim kolitisom esto pokazuju poremećaje motiliteta kolona, uključujući i smanjenje kontraktilnosti, povećanje propulzivnih kontraktilnih talasa, prekomernu proizvodnju azot-monoksida, povećanje VIP-ergičkih neurona (*Todorovi et al., 1996*), IL-1b, neurotenzina, koncentracije tahikinina i slabije delovanje supstance P, verovatno povezano s neuromuskularnom disfunkcijom uzrokovanom zapaljenjem (*Bassoti et al., 2014; Weinstock, 2015*).

Smatra se da su tahikini važan faktor nastanka akutnog i hroničnog zapaljenja, nocicepcije, fibroze, funkcionalnih poremećaja creva i mokraonica, poremećaja sekrecije iz epitelnog elija, hepatitisa, hepatotoksičnosti, holestaze, pankreatitisa, pruritusa, miokarditisa i drugih kardiovaskularnih poremećaja, bronholitisa, abortusa, bakterijskih i virusne infekcija (npr. HIV infekcija), a igra ulogu i u nastanku karcinoma. U pogledu kancerogenog delovanja, pokazano je da SP indukuju proliferaciju tumorskih elija, da ima antiapoptotičko dejstvo i da deluje na angiogenezu i migraciju tumorskih elija u smislu njihove infiltracije okolnih tkiva i nastanak metastaza. Sve ovo ukazuje da je sistem SP/NK1R uključen u molekularnu osnovu mnogih humanih bolesti. Smatra se da će u budućnosti u lečenju tih bolesti svoje mesto dobiti i primena antagonista NK1R, pre svega u lečenju depresije, karcinoma, neurodegenerativnih bolesti, inflamatornih bolesti creva, virusnih infekcija i pruritusa. Danas postoji više NKRA, s različitim stepenom selektivnosti i potentnosti, koji su se pokazali efikasni u prekliničkim studijumima bolesti kod eksperimentalnih životinja. Međutim, trenutno, postoji samo jedan antagonist u klinici koji upotrebi: NK1RA za lečenje mučnine i povraćanja nakon hemoterapije ili primene anestezije tokom operacije. Poznavanje strukture NKRs, te razvoj strategije ciljanja u radi izazivanja prekida u subcelularnim signalima vezanim za NKR kod određenih bolesti, može da dovede

do dobijanja pro i š ene slede e generacije NKRA (Li and Peng, 2014; Lotts et al., 2014; Muñoz et al., 2014; Onaga et al., 2014; Steinoff et al., 2014; Bignami et al., 2015; Fehler, 2015; Muñoz et al., 2015; Sandweiss and Vanderah, 2015; ).

U okviru kardiovaskularnog sistema, SP je uklju ena u regulaciju frekvencije srca, krvnog pritiska i istežanje krvnih sudova. Tako e, igra važnu ulogu u ishemiji i reperfuziji i odgovoru kardiovaskularnog sistema na stres, kao i u angiogenezi i zapaljenju (Mistrova et al., 2015).

Perineuralni rast je jedinstven na in metastaziranja tumora, koji je povezan s lošom prognozom kod više vrsta solidnih tumora. Malo se zna o molekularnim mehanizmima uklju enim u rast i širenje tumorskih elija u perineuralni prostor. Perineuralna stopa rasta je vrlo visoka (63%) kod planocelularnih karcinoma glave i vrata i stoji u direktnoj korelaciji s pove anjem lokalnih recidiva i smanjem perioda bez relapsa. Faktori uklju eni u perineuralni rast kod ovih tumora su moždani neurotrofi ni faktor (BDNF), nervni faktor rasta (NGF), neurotrofin-3 i 4, glijalni neurotrofi ni faktor (GDNF), neuralni celularni adhezivni molekul (NCAM), SP i hemokini. U ovom procesu zna ajnu ulogu imaju i Trk receptori na elijskoj membrani, kao i faktori rasta neurona niskog afiniteta (Roh et al., 2015).



Slika 1.12. Receptori i jonski kanali prisutni na aferentnim nervnim terminalima senzornih neurona.\*  
Li and Peng, *Gland Surgery* 2014; 3(4):284-292.

SP i NKA su glavni ekscitatorni neurotransmiteri u perifernom nervnom sistemu, a NKB prvenstveno u CNS. Štaviše, peptidi iz tahikininske familije imaju ulogu ne samo kao neurotransmiteri nego deluju i kao lokalni faktori koji su uklju eni u gotovo svim aspektima regulacije fizioloških funkcija i patofizioloških procesa. Poznato je da u nastanku bola i upale



u perifernim tkivima, SP ima ulogu medijatora i ta uloga je dobro okarakterisana, s obzirom da se na perifernim nervnim terminalima senzornih neurona nalazi veliki broj različitih receptora na koje deluju mnogi ligandi u cilju njihove aktivacije i oslobađanja SP i CGRP. Naime, edem, inflamacija i elijska nekroza izazvani oslobađanjem SP i CGRP iz aferentnih nervnih terminala senzornih neurona mogu biti podstaknuti sa: triptazama; slobodnim kiseonikom radikalima i prostaglandinima; pritiskom i odgovarajućim osmolaritetom; jonima H<sup>+</sup>, kapsaicinom, visokom temperaturom, anandamidima, LTB<sub>4</sub> i NGF; ATP, CCK, 5-HT, histaminom, bradikininima i dr. supstancama (slika 1.12) (Li and Peng, 2014).

Međutim kakva je precizna uloga SP u odnosu na hematopoezu, venske tromboembolije, tendinopatiju i funkcionisanje ušne ukusa, predmet su intenzivnih istraživanja. Iz tog razloga, zbog činjenice da *ganglion geniculi* sadrži senzorne i senzitivne ganglijske elije uključene u prenos senzitivnih nadražaja i senzacije ukusa, jedan od važnih ciljeva ove doktorske disertacije je ispitivanje prisustva/sinteze SP u *ganglionu geniculi*, s obzirom da je imunoreaktivnost ganglijskih elija na SP nedovoljno ispitana u ovom ganglionu, posebno na humanim uzorcima.

### 1.9.2. Peptid kodiran genom za kalcitonin (CGRP)

Peptid srodan kalcitoninskom genu (engl. Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP) je peptid sastavljen od 37 aminokiselina, koji je primarno lokaliziran u senzornim vlaknima tipa C i A . Postoje dve glavne izoforme ovog peptida - CGRP and CGRP, koje imaju sličnu strukturu i biološku aktivnost, ali ih kodiraju različiti geni. Kod čoveka se one razlikuju samo u tri aminokiseline. Smatra se da se oba gena, *CALCA* (za CGRP) i *CALCB* (za CGRP) stvaraju od istog roditeljskog gena genskom duplikacijom. Inače, oba gena su lokalizovana u neposrednoj blizini, na 11. hromozomu. Gensku familiju ovog peptida, čine 6 članova: kalcitonin, αCGRP, βCGRP, adrenomedulin, adrenomedulin 2 (intermedin) i amilin (Russel et al., 2014).

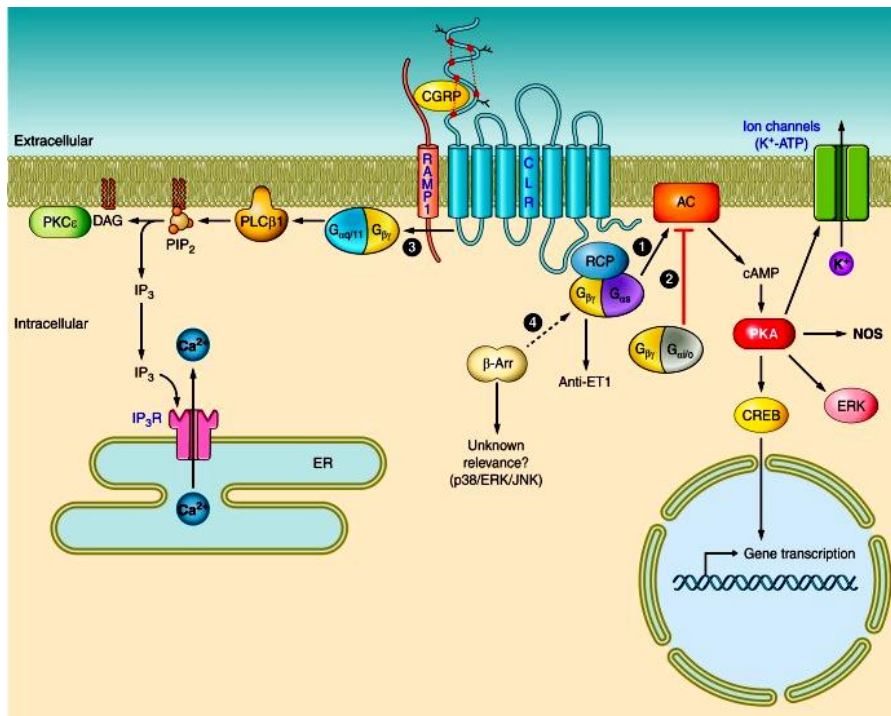
CGRP je otkriven kada je shvaćeno da se prilikom alternativne obrade mRNA za kalcitonin (tkivno-specifični *slicing*) u štitastoj žlezdi pacova u toku starenja, proizvodi CGRP. Potom je izolovan iz štitaste žlezde pacijenata s medularnim karcinomom.

Tradicionalno se smatra da se glavni oblik CGRP nalazi u centralnom i perifernom nervnom sistemu (uključujući i spinalne senzitivne ganglije i trigeminalni ganglion), dok se CGRP nalazi uglavnom u enteričkom nervnom sistemu. U mozgu su identifikovane diskretne regije koje sadrže CGRP<sup>+</sup> neurone, međutim, CGRP-ergička nervna vlakna inervišu

prakti no sve velike organske sisteme u našem telu i tu je lokalizacija prevashodno perivaskularna.

Receptor Activity-Modifying Protein 1, RAMP1) i RCP (engl. Receptor Component Protein, RCP). CLR protein zahteva prisustvo RAMP1 za svoj transport do elijske membrane i vezivanje za CGRP, dok RCP podsti e kuplovanje G s. Kineti ke i biofizi ke studije pokazale su da se dve RAMP1 subjedinice vezuju za CLR- dimer, što omogu ava pozitivnu kooperativnost. Receptor za CGRP generalno aktivira cAMP-signalni put (mada mogu biti uklju eni i drugi putevi) za moduliranje genske ekspresije i regulaciju aktivnosti jonskih kanala. Terminalne rezidue CGRP vezuju se za pukotinu koja se formira izme u N-terminalnog ekstracelularnog domena CLR i RAMP1, što je pra eno vezivanjem terminalnih rezidua CGRP na jukstramembranski domen, ime se omogu ava aktivacija receptora. Klasi ni antagonist CGRP-receptora je C-terminalni fragment koji sadži residue 8-37, koje se vezuju za receptor, ali ga ne aktiviraju. Nedavno je kristalisan CLR/RAMP1 ektodomenski kompleks, ime je dokazano da mali molekuli antagonisti deluju putem blokiranja pukotine za koji se vezuje peptid na granici izme u CLR i RAMP1. CGRP može tako e da se veže i za receptore adrenomedulina i amilina. Adrenomedulinski receptor je izgra en od CLR i RAMP2 ili RAMP3, a amilinski od kalcitoninskog receptora i RAMP1 (*Russo, 2015*).

Intracelurni signali pokrenuti vezivanjem CGRP za receptor ilustrovani su na slici 1.13 (*Russel et al., 2014*).



Slika 1.13. Prenos elijskih signala pokrenutih vezivanjem CGRP za receptor.\*

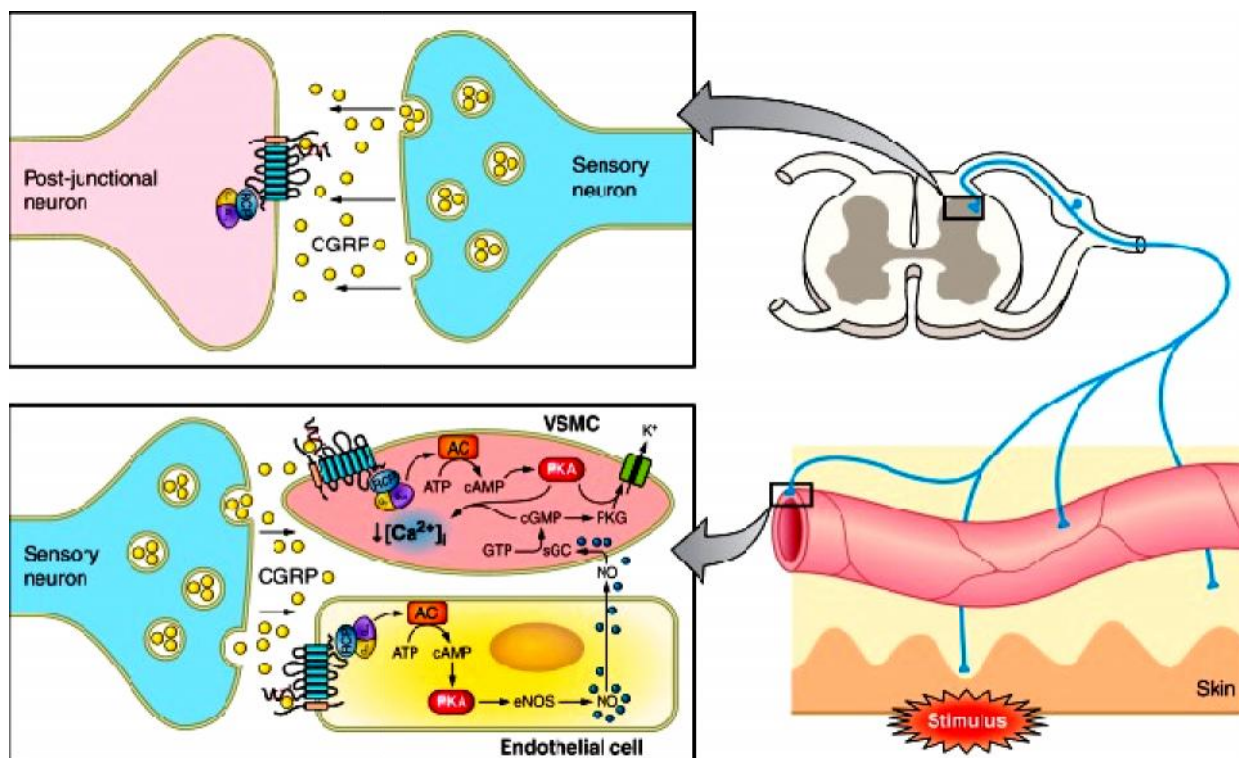
Vezivanje CGRP liganda za CLR/RAMP1 receptor može da dovede do aktivacije brojnih signalnih puteva i kao posledica toga, angažovanja više nishodnih efektora. Kada se aktivira adenilat-ciklaza (AC) pomoću  $G_s$  (1) dolazi do povećanja cAMP, putem povećanja aktivnosti protein-kinaze A (PKA), što dovodi do fosforilacije mnogih nishodnih ciljnih meta, kao što su  $K_{ATP}$ -kanali, ERKs i transkripcioni faktori (npr. CREB). Moguće je da nakon aktivacije CGRP receptora dolazi do produkcije NO, kao posledica sekundarne fosforilacije enzima sintaze NO (NOS). Moguće je i alternativni put u toku koga se CGRP receptor kupluje na  $G_{i/o}$ , pa stoga dolazi do slabljenja aktivnosti AC i smanjenja intracelularne koncentracije cAMP, što rezultira u gubitku aktivnosti PKA (2). Istraživanja na osteoblastima takođe su pokazala postojanje elijske signalizacije posredovane sa  $G_{q/11}$  (3), koja uključuje aktivaciju PLC-1, cepanje  $PIP_2$  radi stvaranja  $IP_3$  i DAG.  $IP_3$  se vezuje za receptor ( $IP_3R$ ) na endoplazmatskom retikulumu (ER), što dovodi do oslobađanja  $Ca^{++}$  i povećanja njegove intracelularne koncentracije. DAG može da aktivira PKC- $\epsilon$ , koji povratno fosforiliše proteine na nishodnom putu. Konačno, postoje dokazi o postojanju G protein-nezavisnog signalnog puta (4) koji zahteva translokaciju skeletnih proteina kao što su  $\beta$ -arestini ( $\beta$ -Arr) u cilju aktivacije receptora. Pored toga, G proteinske subjedinice mogu da prenose signale jedinstvenim načinom, koji se odnose na učinke posredovane endotelinom (ET). Puncne linije označavaju dokazane puteve, a isprekidane hipotetične. \*Russel et al., *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099-1142.

CGRP-erga vlakna imaju dvostruku ulogu – senzornu funkciju (nocicepcija) i eferentnu (efektornu) funkciju. CGRP takođe je lokalizovan i van nervnog sistema, ali je ta lokalizacija u ovom trenutku manje poznata. Uloga CGRP ostaje nejasna, i pored opsežnog istraživanja u prošlosti i danas, i mnogobrojnih rezultata koji su rasvetlili različite aspekte ovog peptida. Izvorno je pokazano da CGRP posreduje u simpatičkim izlaznim signalima iz mozga, ali ubrzo je dokazano da je njegova glavna aktivnost vazodilatatorna, s obzirom da

egzozogena aplikacija CGRP u fentomolarnim dozama na kožu ljudi i različitih životinjskih vrsta dovodi do snažne vazodilatacije. Protektivna uloga CGRP na kardiovaskularni sistem uglavnom je dokazana u studijama na glodarima, ali je ona otvorila mogućnost da CGRP može imati terapijski potencijal u lečenju kardiovaskularnih bolesti. Međutim, senzorna vlakna koja sadrže CGRP takođe su povezana s procesima nastanka bola, pa su današnja istraživanja u vezi ovog peptida najviše usmerena na pronalaženje i kliničku primenu antagonista CGRP-receptora u terapiji migrene i drugih bolnih stanja (*Russel et al., 2014*).

CGRP pokazuje značajan pozitivan efekat na vaskularnu adaptaciju tokom trudnoće, na uteroplacentalnu cirkulaciju i rast fetusa. Osim toga, ovaj peptid može da učestvuje u regulaciji sekrecije spolnih steroidnih hormona (*Yallampalli et al., 2013*).

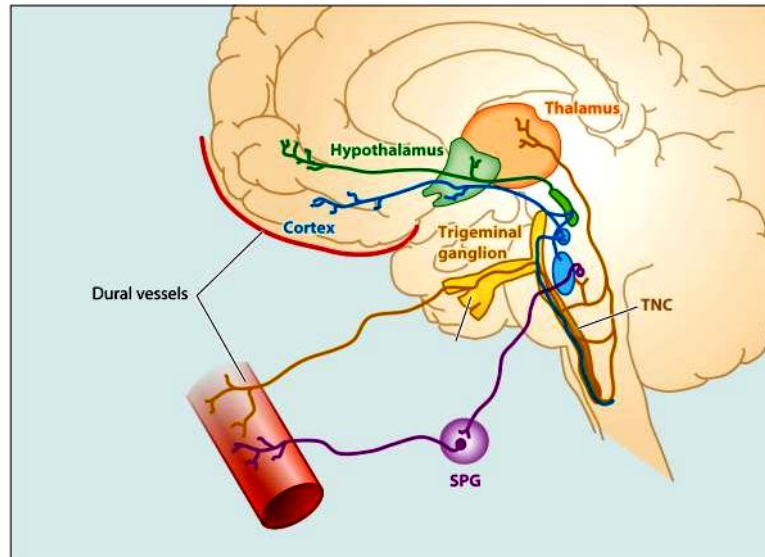
Saznanju da je CGRP prisutan u senzitivnim nervima, umnogome su doprinele studije s kapsaicinom (ekstraktom ili ljute paprike). Odavno je poznato da kapsaicin uzrokuje bol i crvenilo prilikom akutne primene, pre svega zbog sposobnosti da dovede do oslobađanja CGRP i SP, drugog nociceptivnog peptida koji kolokalizira sa CGRP. Danas je poznat mehanizam delovanja kapsaicina na senzorne nervne završetke. Naime, kapsaicin aktivira receptore TRPV1 (engl. Transient Receptor Potential Vanilloid 1, TRPV1) koji se obično nalaze na senzornim vlaknima tipa C i A $\delta$ . Dva ključna nalaza u prošlosti, uticala su da se kasnije shvati pravi biološki značaj CGRP. To su: 1) CGRP se oslobađa u cerebralnu cirkulaciju i tu ispoljava biološku aktivnost, i 2) CGRP je potentni vazodilatator, ali takođe pokazuje strogu recipročnu interakciju sa simpatičkim nervnim sistemom na periferiji. Nasuprot tome, uloge CGRP u zapaljenju nije jednoznačna, s obzirom da je pokazano pro- ali i anti-inflamatorno dejstvo ovog peptida, u zavisnosti od situacije rCGRP je senzorni neuropeptid koji isto kolokalizira sa SP ili somatostatinom u senzornim neuronima (*Molander et al., 1987*). Pored ekspresije u neuronima centralnog i perifernog nervnog sistema, ovaj peptid se eksprimira i u mnogim imunološkim ćelijama, kao što su monociti / makrofazi (*Linscheid et al., 2004*), Langerhansove ćelije epidermisa (*He et al., 2000*) i keratinociti (*Hou et al., 2011*), između brojnih drugih ćelija, pa nije iznenađujuće što se ovaj peptid smatra ključnim regulatorom kožnog imuniteta i proučava se u vezi patogeneze mnogobrojnih kožnih obolenja (npr. psorijaze i atopičnog dermatitisa) (*Granstein et al., 2015*). Međutim, i ovde je glavno dejstvo CGRP, vazodilatacija (slika 1.14).



Slika 1.14. Interakcija između senzornih nerava, kože i arteriola.\*

Antidromna stimulacija senzornog živca rezultira u stvaranju električnog impulsa usmerenog ka kičmenoj moždini i stvaranjem aksonskog refleksa prema perifernim krvnim sudovima gde se otpušta CGRP iz nervnih završetaka, koji deluje na arteriole, uzrokujući i vazodilataciju. CGRP može da posreduje u toj reakciji na dva načina: 1) direktnom aktivacijom svojih receptora na glatkim mišićima krvnih sudova čime dolazi do njihove relaksacije preko G s-puta; i 2) aktiviranjem receptora na endotelnim ćelijama čime se povećava produkcija NO, koji difunduje u glatke mišićne ćelije krvnih sudova i dovodi do njihove relaksacije preko aktivacije GC. CGRP se takođe oslobađa i iz centralnog projekcionog vlakna neurona smeštenih u senzornoj spinalnoj gangliji (DRG), gde može igrati ulogu u centralnoj senzitivizaciji. AC, adenilil-ciklaza; eNOS, endotelna sintaza azot-monoksida; GC, gvanilil ciklaza, NO, azot-monoksid, PKA, protein-kinaza A; PKG, protein-kinaza G; VSMC, glatka mišićna ćelija zida krvnog suda. \*Russel *et al.*, *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099-1142.

CGRP reguliše normalnu hematopoezu, i ima kontrolnu imunološku ulogu (dendriti nečelije, mastociti i T-ćelije), pa je jedan od medijatora u okviru neuroimunološke interakcije. Kod transgenih miševa koji nemaju T-ćelijski receptor (TCR), pretretman sa CGRP dovodi do povećanja produkcije IL-4 koja je praćena smanjenom sintezom interferona- $\gamma$ . CGRP takođe inhibira stimulisanu produkciju Th1-hemokina CXCL9 i CXCL10, međutim indukuje produkciju Th2-hemokina CCL17 i CCL22. Na taj način, CGRP skreće Th1 polarizaciju prema Th2 polarizaciji (Assas *et al.*, 2014).



Slika 1.15. Trigeminalno-vaskularni sistem.\*

Primarni aferentni neuroni u trigeminalnom ganglionu prostiru se od vaskulature moždanih ovojnica do centralnih terminala u kaudalnom delu *nc. spinalis n. trigemini* (TNC, sme e obojen). Neuroni drugog reda u TNC, povratno, projektuju se do zadnjeg talamusa. *Ganglion pterygopalatinum* (SPG, ljubi asto obojen) tako e obezbe uje parasimpatiki refleksi koji inerviše krvne sudove moždanica. *Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2015 ; 55: 533–552.*

Danas se zna da je CGRP uklju en u patofiziologiju migrene. CGRP se osloba a iz aferentnih nervnih vlekana *n. trigemina* u toku migrene i uzrokuje vazodilataciju i neurogenu inflamaciju (slika 1.15). Naime, pove an nivo CGRP pokazan je kako periferno, tako i centralno kod pacijenata sa migrenom. Antitela na CGRP, kao i antagonisti ovog polipeptida, mogu da smanje ja inu migrene redukcijom nivoa CGRP ili blokiranjem njegove aktivnosti, pri emu je dejstvo antitela na CGRP ograni eno na periferna dejstva, dok antagonisti deluju centralno (*Russo, 2015*). Upotreba lekova za migrenu iz grupe triptana, ograni ena je zbog sporednih kardiovaskularnih problema uzrokovanih vazokonstrikcijom i pojave glavobolje, kao i zbog neefikasnosti kod odre enog broja pacijenata. Godine 2000, farmaceutska ku a *Boehringer Ingelheim* objavila je farmakološki profil BIBN4096BS (Olcgepant), prvog selektivnog ne-peptidnog antagoniste CGRP, koji može da blokira vazodilataciju stimulisanu trigeminusom kod marmoseta. Usledile su studije pra enja koje su pokazale da BIBN4096BS nema efekte na lokalnu i sistemsku hemodinamiku kod ljudi i eksperimentalnih životinja, ime je ukazano da antagonisti CGRP, za razliku od triptana, ne izazivaju sporedne efekte na kardiovaskularnom sistemu. U fazi II, BIBN4096BS je testiran u internacionalnoj multicentri noj, duplo slepoj randomiziranoj studiji na 126 pacijenata sa migrenom, i ova ispitivanja su pokazala pozitivan odgovor na terapiju u 60% slu ajeva. Ono

što je nepovoljno kod terapijske primene ovog leka je činjenica da se može aplikovati samo intravenski. Stoga su dalja istraživanja bila usmerena na dobijanje oralnih CGRP antagonista, i 2007 godine Merck je publikovao podatke o novom leku MK-0974 (telcagepant) koji je efikasan u lečenju migrene i može se uzimati oralno. Faza II kliničkih studija sa ovim novim lekom pokazala je njegovu visoku efikasnost i tolerogenost. U fazi III kliničke studije proučeno je 1.380 pacijenata kod kojih je pokazana visoka efikasnost upotrebe ovog novog leka, u smanjenju bola, nauzeje i fotofobije (*Bigal et al., 2015; Russo, 2015*).

Danas su veoma aktuelna i istraživanja u vezi pronalazača antagonista CGRP receptora koji bi imali terapijsku primenu, osim kod već spomenute migrene, kod artritisa, različitih oboljenja kože, dijabetesa i gojaznosti (*Ding et al., 2013; Grässel, 2014; Bigal et al., 2015; Granstein et al., 2015; Russo, 2015; Tajti et al., 2015; Walter and Bigal, 2015*).

### **1.10. Mastociti kao medijatori nocicepcije**

Nocicepcija je proces prenošenja senzacije iz primarnih aferentnih neurona iz perifernih regiona tela u mozak, preko sekundarnih neurona u kičmenoj moždini. Ponovljeni noksogeni stimuli nociceptora u estvuju u stvaranju centralne senzacije koja dovodi do hroničnog bola povezanog sa mnogim bolestima. U novije vreme, interakcija između imunološkog i nervnog sistema poznata kao neuroimunološka osovina, stavlja se u centar pažnje u cilju razjašnjenja molekularnih mehanizama koji leže u osnovi periferne i centralne senzibilizacije koja dovodi do hroničnog bola. Povećanje broja mastocita, njihova pojačana degranulacija, blizak odnos sa nervima, povećano oslobađanje SP i posledici na hiperalgeziju, dovode se u vezu sa nastankom hroničnog bola. Parakrina interakcija između mastocita i nervnog sistema na različitim nivoima nervnog sistema je kompleksna, a molekularni mehanizmi koji leže u njenoj osnovi nisu dovoljno razjašnjeni.

Mastociti se nalaze u blizini nervnih vlakana, pa stoga predstavljaju idealne kandidate za modulaciju nervne aktivnosti i nocicepcije. Postoji recipročna interakcija između mastocita i nervnih vlakana. Kao primer za to može da se navede da medijatori oslobođeni iz mastocita, kao što su npr. triptaza i histamin, dovode do oslobađanja neuropeptida (SP i CGRP) iz proksimalnih nervnih završetaka (*Kleij and Bienenstock, 2005*), a SP dalje aktivira mastocite (*Matsuda et al., 1989*). Povećanje broja mastocita u proksimalnim delovima nervnog sistema i poremećaji u strukturi nervnih vlakana korelirani su sa nervnim faktorom rasta (NGF), medijatorom koji se oslobađa i iz mastocita i iz nervnih završetaka, pa je

zaključeno da za nastanak hiperalgezije imaju značajna oba izvora. Povećana degranulacija mastocita, i povećanje njihovog broja na periferiji, kao i broj mastocita u duri i talamusu, učestvuju u hiperalgeziji što je potvrđeno mnogobrojnim eksperimentima na animalnim modelima. Danas je poznat širok niz obolenja povezanih sa pojavom bola, u kojima ključnu ulogu imaju mastociti. To su: bolest aktivacije mastocita, migrena, pelvični bol, hronični bolni sindrom u pelvisu povezan sa hroničnim prostatitisom, hronični pelvični bol kod žena, sindrom iritabilnog kolona, vulvodinija, kompleksni regionalni bolni sindrom, fibromijalgija, kancerski bol, bol kod bolesti srpastih ćelija i slično (Aich *et al.*, 2015).

Snažan stimulan za degranulaciju mastocita je agregacija FcεRI receptora izazvana Ag-IgE kompleksima. IgE molekule stvaraju plazmocite, ćelije imunskog sistema koje stvaraju antitela. FcεRI stimulacija započinje signalnu kaskadu koja uključuje aktivaciju tirozin kinaza, kao što su Syk, Lyn i BTK i fosforilaciju mnogih protein adaptacije, koji igraju važnu ulogu u polimerizaciji mikrotubula, translokaciji granula do plazmaleme i degranulaciji mastocita. Degranulaciju izazivaju fizički faktori, toksini, endogeni medijatori i imunski mehanizmi. Njihove granule sadrže medijatore zapaljenja, kao što su heparin, histamin, serotonin, proteaze, lipidni medijatori (tromboksan, prostaglandin D2, leukotrien C4 i trombocitni aktivirajući faktor) i citokini (Nishida *et al.*, 2005). -triptaza je proteaza koja je najsnažniji medijator uskladišten u sekretornim granulama mastocita. Ima važnu ulogu u zapaljenju i služi kao marker aktivacije mastocita iz kojih se oslobađa i stimuliše sekreciju susednih mastocita. Mastocitna triptaza aktivira proteazom aktivirane receptore (PAR-2), što dovodi do ekscitacije senzornih neurona (koji ove receptore eksprimiraju u 60% slučajeva) i stimuliše oslobađanje SP i CGRP iz njih (koji se eksprimiraju u 40% aksona). Mastocite nalazimo u dobro vaskularizovanim i inervisanim tkivima, posebno u blizini granice predela spoljašnje i unutrašnje sredine, kao što je koža, sluznica respiratornog i digestivnog sistema. Dura mater je intrakranijalna struktura bogato inervisana nociceptivnim vlaknima u kojoj uz krvne sudove nalazimo i brojne mastocite. Aktivisana meningealna nociceptivna vlakna oslobađaju neuropeptide, kao što su SP i CGRP, koji pokreću aktivaciju i degranulaciju duralnih mastocita (Levy *et al.*, 2007).

Kako po našem saznanju nema literaturnih podataka o prisustvu mastocita u tkivu *ganglion geniculi* kod ovećveka, jedan deo ove studije bio je usmeren na imunohistohemijsko markiranje mastocita u ovom senzornom ganglionu.



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Nedovoljno poznavanje i postojeće dileme u vezi mikroanatomije, topografskih odnosa sa okolnim strukturama, citološke i histološke organizacije *ganglionu geniculi* facijalnog živca kod oveka, kao i njegove vaskularizacije i ekspresije neuropeptida i neurotransmitera u ganglijskim elijama, bilo je osnovna smetnica i inicijator u istraživanjima obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom. Iz tog razloga postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. odrediti mikroanatomske karakteristike *ganglionu geniculi* (oblik, dimenzije) i njegove odnose sa okolnim strukturama, koristeći deskriptivne i morfometrijske metode istraživanja;
2. odrediti zastupljenost i brojnost ganglijskih elija i klasifikovati ih (uključujući i akcesorne ganglijske elije), kao i broj satelitskih elija, i zastupljenost vezivno-otkivne komponente (retikularnih, kolagenih i elastičnih vlakana i mastocita) 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 ina grananja i vaskularnih anastomoza (injiciranjem 10% mešavine želatina i crnog tuša u formaldehidu u arterijsko stablo piramide temporalne kosti);
4. odrediti imunohistohemijsku ekspresiju u ganglijskim elijama:
  - pan-neuronskih markera – neuron-specifične enolaze (NSE), S100-proteina, proteinskog genskog produkta 9.5 (PGP9.5), sinaptofizina (Syn), neurofilamentnog proteina velike molekulske težine (NF-H, 200kDa) i DNK-vezujućeg proteina nukleusa neurona (NeuN),
  - neuropeptida – supstance P (SP), peptida regulisanog kalcitoninским genom (CGRP), vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), neuropeptida Y (NPY) i somatostatina (So),
  - neurotransmitera – gama-amino buterne kiselinje (GABA), acetil-holina (ACh), adrenalina/ noradrenalina, dopamina (DOPA) i
  - drugih proteina (parvalbuminA) i transkripcionih faktora (Nurr1) važnih za funkcionalnu aktivnost ganglijskih elija.

Navedena istraživanja omogućila su, s jedne strane, da se precizno ustanovi mikroskopska topografija gangliona geniculi, što ima veliki značaj za bezbednije mikrohirurške intervencije u ovom predelu, a s druge strane, rešavanje dileme oko izvora vaskularizacije gangliona, tj. da li je jedini izvor *ramus petrosus a. meningae mediae* ili je dodatni izvor *a. auditiva interna*. Takođe, istraživanja su omogućila i utvrđivanje prisustva i zastupljenosti u ganglijskim elijama različitih neuropeptida i neurotransmitera, kao i poređenje citoloških i imunohistohemijskih karakteristika somatosenzornih i gustatornih neurona kako u samom ganglionu, tako i akcesornih (ektopičnih) ganglijskih elija.

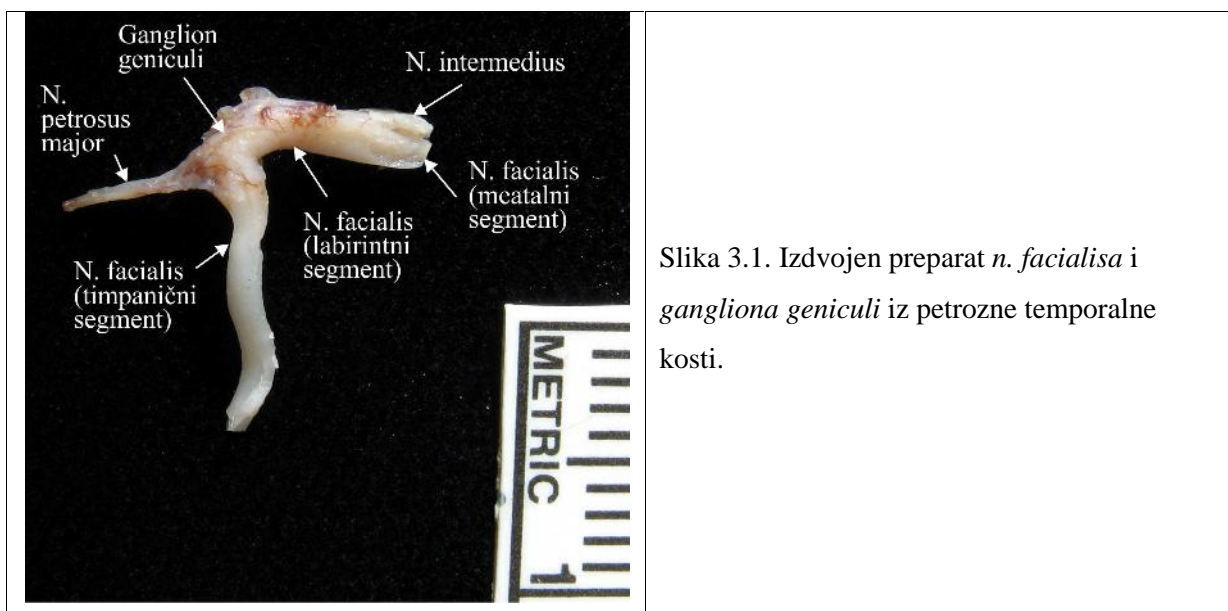
### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorak

Istraživanja su obavljena na 20 izolovanih *ganglion geniculi*, kao i na 14 piramida temporalnih kostiju sa *ganglionom geniculi* odraslih osoba oba pola. Uzorci su dobijeni u toku obdukcija na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, u periodu od januara 2009. do decembra 2012. godine. Umrle osobe od kojih su dobijeni navedeni uzorci nisu imale obolenje centralnog nervnog sistema, vestibulo-kohlearnog aparata niti piramide temporalne kosti.

#### 3.1.1. Uzorak za mikromorfološka i morfometrijska istraživanja vaskularizacije i proučavanje topografskih odnosa *ganglion geniculi* sa okolnim strukturama

Mikromorfološka i morfometrijska istraživanja vaskularizacije genikulatnih ganglionima izvršena su na 14 petroznih delova temporalnih kostiju sa genikulatnim ganglionima, dobijenih sa kadavera osoba oba pola (9 muških i 5 ženskih), starosti od 36 - 69 godina (prose no 52,1 godina), obdukovanih na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Sve osobe bile su bez patoloških promena na moždanim strukturama, vestibulo-kohlearnom aparatu i piramidi temporalne kosti.



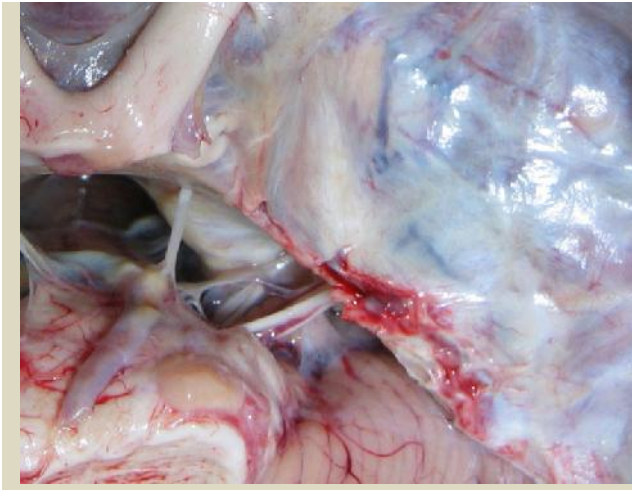
### 3.1.2. Uzorak za histološka, histohemijska i imunohistohemijska istraživanja

Histološka, histohemijska i imunohistohemijska istraživanja izvršena su na preparatima 20 izolovanih genikulatnih gangliona (slika 3.1.) dobijenih sa kadavera osoba oba pola (8 muških i 12 ženskih) starosti od 41-67 godina (prose na starost 55,3 godine).

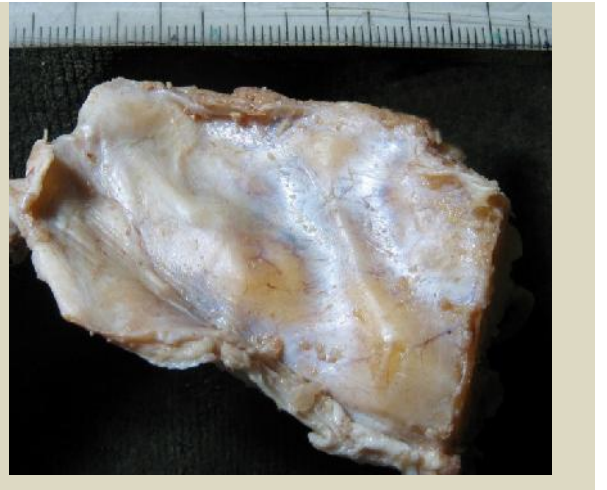
### 3.2. Ispitivanje vaskularizacije *ganglion geniculi*

Mikromorfološka i morfometrijska istraživanja vaskularizacije genikulatnih gangliona izvršena su na 14 petroznih delova temporalnih kostiju sa genikulatnim ganglionima dobijenih sa kadavera osoba oba pola (9 muških i 5 ženskih), starosti od 36 – 69 godina (prose no 52,1). Za va enje mozga iz lobanje koriš ena je uobi ajena tehnika obdukcije sa pažljivim odsecanjem facijalnog nerva uz moždano stablo. Po va enju mozga petrozni deo temporalne kosti opsecan je sa lobanjske strane elektri nom vibracionom testerom sa dva reza, uzdužno u nivou vrha i paralelno prvom rezu kroz lobanjsku stranu baze piramide, zatim paralelno gornjoj ivici piramide ispred i iza koštanog masiva piramide. Tako dobijeni koštani blok odvajan je skalpelom od vezivnog i miši nog tkiva uz donju stranu piramide. Pažljivom disekcijom, uz infratemporalnu stranu spinoznog otvora izdvajano je stablo *a. meningeae mediae* (AMM) u koju je fiksirana plasti na kanila kroz koju je u arterijski sistem gangliona injiciran, najpre fiziološki rastvor, zatim rastvor 4% neutralnog puferisanog formaldehida, a na kraju 5% mešavina rastopljenog želatina i crnog tuša. Preparat je zatim, po uklanjanju viška mešavine tuša i želatina toplom vodom i o vrš avanju želatina u hladnoj vodi, fiksiran u 10% rastvoru formalina i glicerola u trajanju od 21 dan (slike 3.2. i 3.3) (*Duvernoy, 1978*).

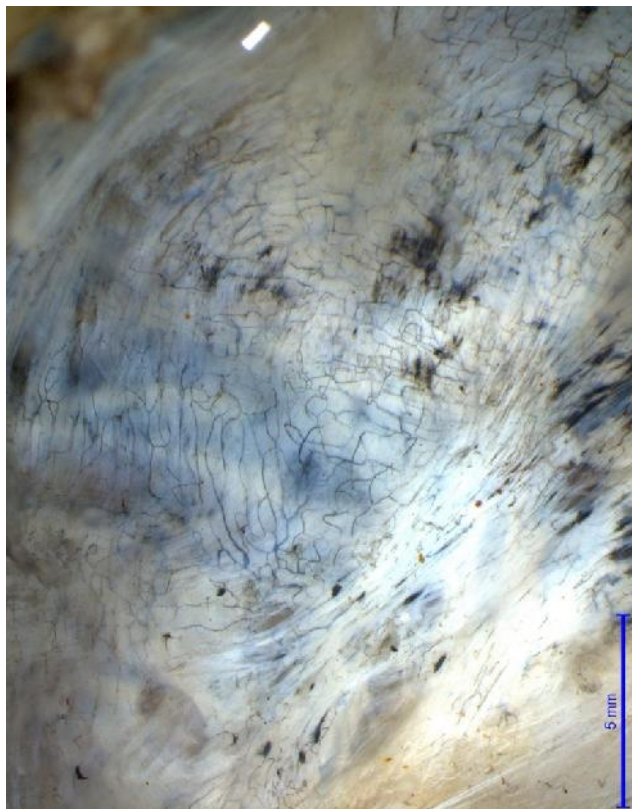
Mikrodisekcija injiciranih krvnih sudova facijalnog nerva i gangliona pomo u mikroinstrumenata i sva merenja okularnim mikrometrom obavljena su pod stereomikroskopom (*Leica MZ6*) na 12 probranih, dobro injiciranih nerava i gangliona. Disekcija se sastojala u pažljivom uklanjanju duralnog pokriva a lobanjske strane preparata i otvaranje epiduralnog prostora (slike 3.4. i 3.5). Po odizanju dure, presecanjem brojnih vezivnih snopi a koji je vezuju za prednju stranu piramide i velika krila sfenoidne kosti, otkrivali smo stablo *n. petrosus majora* i prate i nerv dolazili smo do malog otvora, *hiatus canalis n. petrosi majoris*, koji oza ava mesto izlaska nerva iz bubne duplje, ali i poziciju gangliona pod njim. Tako e, disekcija je obuhvatala i otkrivanje srednje moždani ne arterije, kao i njenih finih grana namenjenih ovom nervu i ganglionu. Po fotografisanju i merenju nastavljali smo disekciju uzdužnim presecanjem piramide



Slika 3.2. Pogled na desnu srednju lobanjsku jamu po va enju mozga (obdukcija).



Slika 3.3. Koštani blok desnog petroznog dela temporalne kosti po va enju iz lobanje.



Slika 3.4. Injicirani krvni sudovi dure srednje lobanjske jame, pogled odozgo (tuš želatin).



Slika 3.5. Odizanje injicirane dure srednje lobanjske jame, (tuš želatin).

i otvaranjem bubne duplje da bi se otkrio sam genikulatni ganglion i stablo facijalnog nerva u svom koštanom kanalu. Svi preparati su fotografisani digitalnim foto aparatom (*Canon Power Shot A710*), a svi detalji pod stereo mikroskopom snimljeni su digitalnom kamerom

(Leica DFC295). Vaskularna mreža facijalnog nerva i gangliona i topografski odnosi sa okolnim arterijama ucrtavani su u unapred pripremljenu šemu.

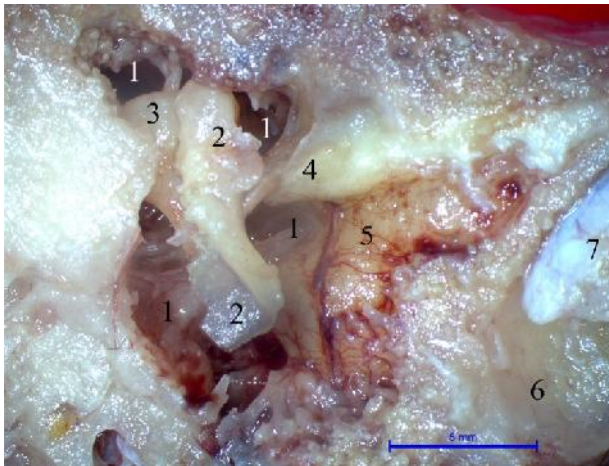
Dodatno, za analizu intraganglijske vaskularne mreže korišteni su histološki preparati genikulatnih gangliona histohemijski bojeni korišćenjem trihromne metode bojenja po Massonu, kao i preparati gde je primenjena imunohistohemijska (IHH) reakcija aplikacijom primarnog antiseruma na endotelni vaskularni marker CD34.

### 3.3. Morfometrijska studija položaja gangliona genikuli

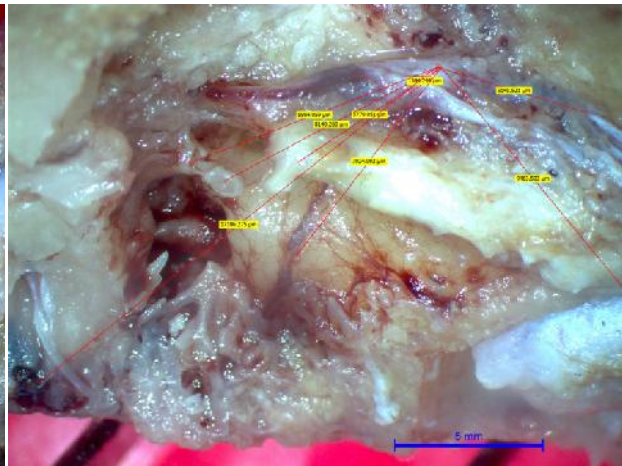
Morfometrijska studija položaja genikulatnog gangliona obavljena je na 10 izabranih petroznih delova temporalnih kostiju sa genikulatnim ganglionima iz serije preparata pripremljenih za studiju genikulatne vaskularizacije. Koštani blok petroznog dela temporalne kosti, dobijen na opisani način tokom rutinske obdukcije, pažljivo je rotacionom testerom uzdužno presecan, paralelno njegovoj gornjoj ivici. Ravan idealnog preseka kosti prolazila je kroz karotidni kanal, neposredno upolje od bubne opne (slika 3.6). Po uzdužnom presecanju piramide, otvaranjem bubne duplje pristupali smo budućem polju naših merenja. Da bi se otkrili referentni anatomske elementi nastavljali smo disekciju i pažljivo uklanjali ostaci bubne opne, kao i nakovanj. Po odizanju dure od kosti, presecanjem brojnih vezivnih snopi a koji je vezuju za prednju stranu petroznog dela temporalne kosti i velika krila sfenoidne kosti, otkrivali smo stablo *n. petrosus majora* i prateći nerv dolazili smo do malog otvora, *hiatus canalis n. petrosi majoris*, koji označava mesto izlaska nerva iz njegovog koštanog kanala, ali i poziciju genikulatnog gangliona, dublje od njega. Tako smo pažljivo izolovali stablo *a. petrosae*, do mesta njenog ulaska u kost kroz poseban otvor (*foramen a. petrosae*) neposredno medijalno i ispred izlaznog otvora malog petroznog nerva (ili ređe do njihovog zajedničkog otvora). Daljom mikrodisekcijom korišćenjem Leica MZ6 stereomikroskopa, na uvećanju x63, pažljivo smo uklanjali koštani prekrivač genikulatnog gangliona i otkrivali, pored kolena i labirintni i timpanični deo facijalnog nerva. Polja mikroskopske analize snimljena su Leica DFC295 digitalnom kamerom, a za morfometrijsku analizu distanci genikulatnog gangliona korišćen je softver Leica Interactive Measurements (slika 3.7).

Definisano je 8 distanci koje su merene od centralnog dela genikulatnog gangliona, na mestu samog kolena facijalnog nerva, na svih 10 izabranih preparata. Mereni su rastojanje do mesta najkonveksnijeg dela spoljašnjeg obima unutrašnje karotidne arterije u karotidnom kanalu, zatim do centralnog dela vrha kohlleariformnog nastavka na mestu izlaska tetive mišića zatezača bubne opne, pa do centralne tačke glave uzengije, takođe do mesta odvajanja

velikog petroznog nerva od stabla timpani nog dela facijalnog nerva, zatim do najispup enije centralne ta ke promontorijuma, pa do stilomastoidnog otvora, tako e do središnjeg dela vrha piramidalnog uzvišenja na mestu izlaska tetive miši a uzengije i na kraju do ulaznog otvora petrozne arterije.



Slika 3.6. Pogled na bubnu duplju (1) po uklanjanju njenog spoljašnjeg zida: 2) eka sa fragmentom bubne opne, 3) nakovanj, 4) processus cochleariformis, 5) promontorium, 6) karotidni kanal, 7) a. carotis interna.



Slika 3.7. Preparat pripremljen za morfometrijsku analizu distanci od samog genikulatnog gangliona i na in aplikacije programa *Leica Interactive Measurements*.

### 3.4. Priprema uzoraka za histohemijske i imunohistohemijske metode ispitivanja

Materijal za histohemijske i imunohistohemijske metode bojenja pripreman je na standardan na in. Uzorci *gangliona geniculi* su fiksirani u 4% neutralnom pufersanom rastvoru formaldehida tokom 24 asa, u volumenu 20 puta ve em od volumena tkiva koje se fiksira. Potom su dalje pripremani rutinskom procedurom, koja obuhvata dehidraciju, prosvetljavanje, impregnaciju i kalupljenje u parafinu / paraplustu (*Bio-Plast plus, BioOptica, Italy*). Svaki uzorak gangliona ukalupljen u parafinu se en je popre no, serijski, na mikrotomu (*RM 2255, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*) sve dok ganglion nije kompletno ise en, a redosled preseka pažljivo obeležen. Tkivni preseci debljine 4-5  $\mu\text{m}$  su montirani na specijalne visokoadhezivne staklene plo ice (*SuperFrost Plus, DAKO, Denmark*), sušeni 60 minuta u termostatu na 56°C, a potom bojeni.

Prvi, kao i svaki deseti presek kroz ganglion, bojeni su hematoksilin-eozinom, da bi se lakše orijentisali oko izdvajanja preseka sa najve im dimenzijama gangliona, koji su bili iskoriš eni za morfometrijsku obradu. Preseci u njihovoj neposrednoj blizini iskoriš eni su za imunohistohemijsko bojenje neuropeptida i neurotransmitera, kao i pan-neuronskih markera,

a dalji preseci za ostala imunohistohemijska i histohemijska istraživanja. Svaka metoda bojenja sprovedena je na po dva tkivna preseka, udaljena jedan od drugog 25 µm.

### **3.5. Histohemijske metode ispitivanja**

Primenjene su slede e histohemijske metode bojenja: trihromsko bojenje po Massonu, Trihromno bojenje po Picro-Malloryju, Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna, Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elasti na vlakna i vezivo, Bojenje elasti nih vlakana sa orceinom, Bojenje po Bielschowskom za neurofibrile i Bojenje po Kluver-Barreri (slike 3.8 - 3.15). Za bojenje su koriš eni komercijalni kitovi proizvo a a Bio-Optica (*Strumentazioni Scientifiche, Milano, Italy*) i poštovani su protokoli za upotrebu.

#### **3.5.1. Trihromno bojenje po Massonu**

Primenjene su dve varijante trihromskog bojenja po Massonu – sa anilinskim plavim i sa Goldnerovim svetlozelenim.

##### **Trihromno bojenje po Massonu sa anilinskim plavim**

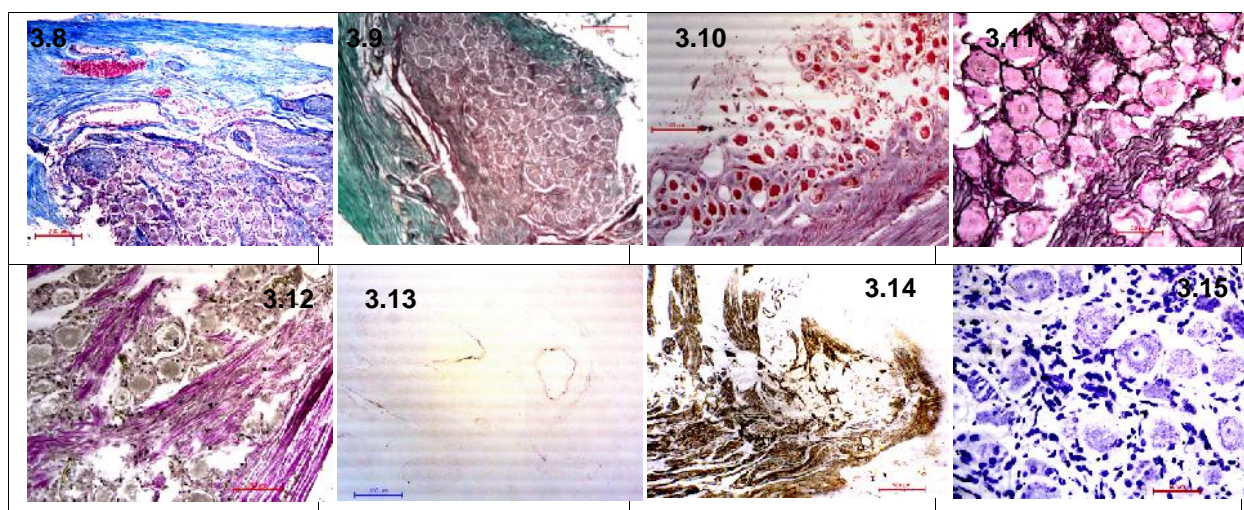
U ovoj metodi bojenja koristi se rastvor gvož evitog hematoksilina po Weigertu, alkoholni rastvor pikrinske kiseline, kiseli rastvor fosfomolibdena i rastvor anilinskog plavog. Rezultat bojenja su crno obojena jedra elija; crveno su obojeni citoplazma, keratin, miši na vlakna i granule acidofilnih elija adenohipofize; plavo se boje kolagena vlakna, mukus i granule bazofilnih elija i delta- elija adenohipofize, a eritrociti su žuto obojeni.

##### **Trihromno bojenje po Massonu sa Goldnerovim svetlo zelenim**

Koriste se isti rastvori kao kod prethodno opisane varijate ove metode, samo što se umesto anilinskog plavog upotrebljava rastvor svetlozelenog po Goldneru.

Rezultat bojenja su crno obojena jedra elija; citoplazma, keratin, miši na vlakna i granule acidofilnih elija adenohipofize boje se crveno; zeleno su obojena kolagena vlakna, mukus i granule bazofilnih elija adenohipofize, a zuto granuile delta elija adenohipofize.





Slike 3.8-3.15. Histochemijske metode bojenja genikulatnog gangliona: trihromsko bojenje po Massonu sa anilinskim plavim (3.8), trihromno bojenje po Massonu sa Goldnerovim svetlozelenim (3.9), trihromno bojenje po Picro-Maloryju (3.10), bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna (3.11), bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastina vlakna i vezivo (3.12), bojenje elastinih vlakana sa orceinom (3.13), bojenje po Bielschowskom za neurofibrile (3.14) i bojenje mijelina po Kluver-Barreri (3.15).

### 3.5.2. Trihromno bojenje po Picro-Malloryju

U ovoj metodi bojenja koristi se rastvor gvoždovitog hematoksilina po Weigertu, alkoholni rastvor pikrinske kiseline, polihromni rastvor sa fukcinom, kiseli rastvor fosfomolibdena i rastvor anilinskog plavog. Rezultat bojenja su tamnosmeđe obojena jezra elija; tamnoplavo su obojena kolagena vlakna; osnovna supstanca hrskavice i kosti, mukus, granule bazofilnih elija adenohipofize i amiloid obojeni su različitim nijansama plave boje; neuroglija, aksonski cilindri i fibrin boje se crveno, a granule acidofilnih elija adenohipofize narandžasto; mijelin i eritrociti obojeni su žuto a elastina vlakna svetloružičasto do žuto.

### 3.5.3. Bojenje po Gordon-Sweetu za retikularna vlakna

Ovom metodom prezentuju se argirofilna retikularna vlakna u vezivnom tkivu. U vrlo kratkom vremenu bojenja moguće je izvršiti selektivnu impregnaciju retikularnih vlakana zahvaljujući i dvoma faktorima: preliminarnoj impregnaciji sa solima gvožđa i upotrebi kao izvora srebra nestabilnog diamino-kompleksa (amonijakni rastvor) koji je reaktivniji od srebro-nitrata. Rezultat bojenja su crno bojena retikularna i nervna vlakna i crveno obojena jezra elija.

#### **3.5.4. Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elasti na vlakna i vezivo**

Regensi koji se koriste kod ovog bojenja su rastvor perjodne kiseline, Weigertov rastvor, Weigertov gvož eviti hematoksilin i Van Giesonov rastvor pirofuksina. Rezultat bojenja su elasti na vlakna obojena u nijansama od tamnoplavog do crnog, kolagena vlakna obojena razli itim nijansama crvene boje, a vezivo i eritrociti su žuti; jedra elija crno su obojena.

#### **3.5.5. Bojenje elasti nih vlakana sa orceinom**

U metodi se koriste rastvori kalijum-permanganata, oksali ne kiseline i orceina po Shikati. Na neobojenoj pozadini, elasti na vlakna su braonkasto-ruži asto crvena.

#### **3.5.6. Bojenje po Bielschowskom za neurofibrile**

Ova metoda impregnacije solima srebra našla je široku primenu u neurohistologiji za prikazivanje neurofibrila, aksona, dendrita i senilnih plakova kod Alzheimerove bolesti. Metoda se zasniva na slede em principu: srebro prisutno u amonija nom rastvoru u formi kompleksnog hidrosolubilnog oksida  $[(Ag(NH_3)_2)_2O]$  se u prisustvu odre enih celularnih komponenti redukuje u crno, stabilno i nerastvorljivo metalno stanje. Na žutoj do dimsme e obojenoj pozadini prezentuju se crno obojeni nerurofibrili, aksoni i dendriti.

#### **3.5.7. Bojenje mijelina po Kluver-Barreri**

Metodom bojenja sa *luxol fast blue* po Kluver-Barreri boje se mijelin i fosfolipidi na histološkim preparatima. Boja *luxol fast blue* je derivad tetrabenzoterazo-porfirina, a porfirini imaju selektivni afinitet za mijelin, tj. imaju sposobnost vezivanja za fosfolipidne strukture kao što su lektini i sfingomijelini. Ovom metodom mijelin se boji tirkiznoplavo, neuroni i jedra glija elija su obojeni ruži asto do ljubi asto, a Nislova supstanca je obojena svetloruži asto.

### **3.6. Imunohistohemijske (IHH) metode ispitivanja**

Prikaz razli itih imunohistohemijskih markera primenjenih u ovom istraživanju dat je u tabeli 1, a imunohistohemijska bojenja sa ovim markerima na uzorcima genikulatnog ganglionu ili kontrolnim uzorcima pregledno su data na slikama 3.19-3.40.

Prilikom imunohistohemijskog bojenja koriš ena su dve vizuelizacione tehnike (pogledati tabelu 3.1) – metoda u kojoj je streptavidin-biotin obeležen peroksidazom (engl. Labeled Streptavidin-Biotin, Horse redish Peroksidaze; Dako LSAB+/HRP kit, Code K0679, Dako, Denmark) i metoda sa duplo obeleženim polimerom sa peroksidazom (DakoCytomation EnVision+ Dual Link System-HRP, Code K4065, DakoCytomation, Denmark).

### **3.6.1. Dako LSAB+/HRP imunohistohemijska tehnika**

Jedna od danas naj eš e koriš enih indirektnih imunohistohemijskih metoda jeste trostepena avidin-biotin metoda. Dve najpoznatije avidin-biotin metode danas su avidin-biotin kompleksna metoda (ABC) i obeležena avidin/streptavidin)-biotin tehnika (engl. Labeled Avidin/sStreptavidin Biotin, LAB/SAB). Obe metode zahtevaju biotinizirano antitelo kao vezuju e antitelo. Biotinizacija predstavlja diskretan proces u toku koga se biotin kovalentno vezuje za antitelo. Otvorena mesta na avidinu iz avidin-biotin kompleksa ili enzimom obeleženog avidina, vezuju se za biotin na vezuju em antitelu. Naj eš e upotrebljavani enzimi za obeležavanje u ovim procesima su peroksidaza rena ili alkalna fosfataza.

#### **Princip metode**

Dako LSAB<sup>+</sup> kit, u kome je streptavidin obeležen peroksidazom, bazira se na obeleženoj streptavidin-biotin (SAB) metodi, ali koristi visoko “rafiniranu” avidin-biotin kompleksnu trostepenu tehniku (ABC) u kojoj biotinizirano sekundarno antitelo reaguje sa nekoliko streptavidinskih molekula konjugovanih peroksidazom. Radi se o ekstremno osetljivoj i prilagodljivoj imunohistohemijskoj metodi, koja je u pore enju sa ABC metodom senzitivnija ak 8 puta. S obzirom da se u kitu nalazi poja an sistem stvaranja signala za detekciju antigena prisutnih u niskim koncentracijama, tj. sistem koji omogu ava pove anje intenziteta bojenja kao kompenzaciju za nizak titar primarnog antitela, optimalno razblaženje primarnog antitela je do 20 puta ve e nego u klasi noj peroksidaza-antiperoksidaza (PAP) tehnici, tj. nekoliko puta ve e nego u klasi noj ABC ili SAB tehnici.

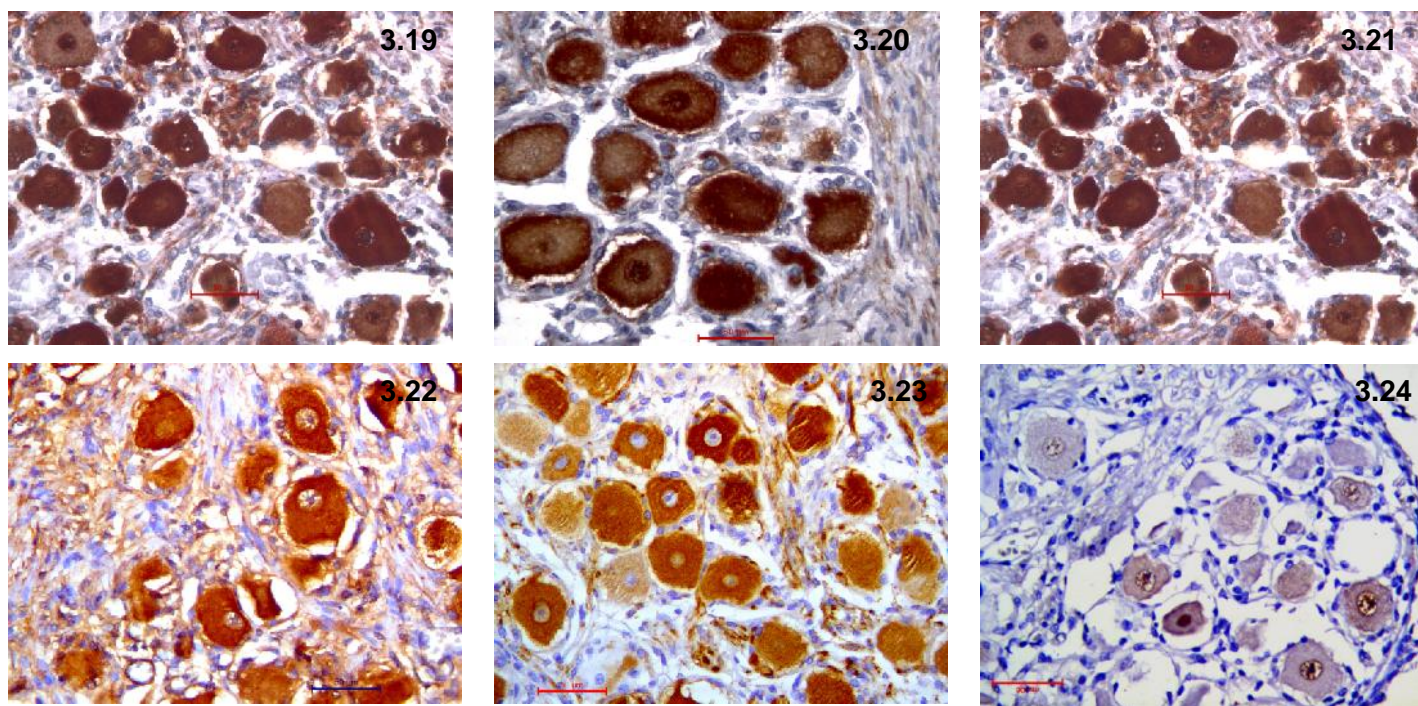
U avidin/streptavidin-biotin metodi koristi se visok afinitet avidina ili streptavidina prema biotinu (disocijaciona konstanta  $10^{-19}$  M). Na avidinu se nalaze 4 vezuju a mesta za biotin. Me utim, zbog molekularne orijentacije biotin-vezuju ih mesta, stvarno se vezuje manje od 4 molekula biotina. Biotinizacija je diskretan proces u toku koga se biotin kovalentno vezuje za antitelo. Otvorena mesta na avidinu iz kompleksa avidin-biotin ili avidina obeleženog enzimom, vezuju se za biotin na vezuju em antitelu. Biotinizirano

antitelo se ne dodaje u višku pošto za vezivanje nisu potrebna slobodna Fab-mesta. Peroksidaza rena (engl. *Horst Readish Peroxidase* – HRP) je enzim za obeležavanje u ovim procedurama. Jak afinitet avidina za biotin i diskretna biotinizacija ine avidin-biotin metodu senzitivnijom od svih ranije opisanih direktnih ili indirektnih imunohistohemijskih postupaka.

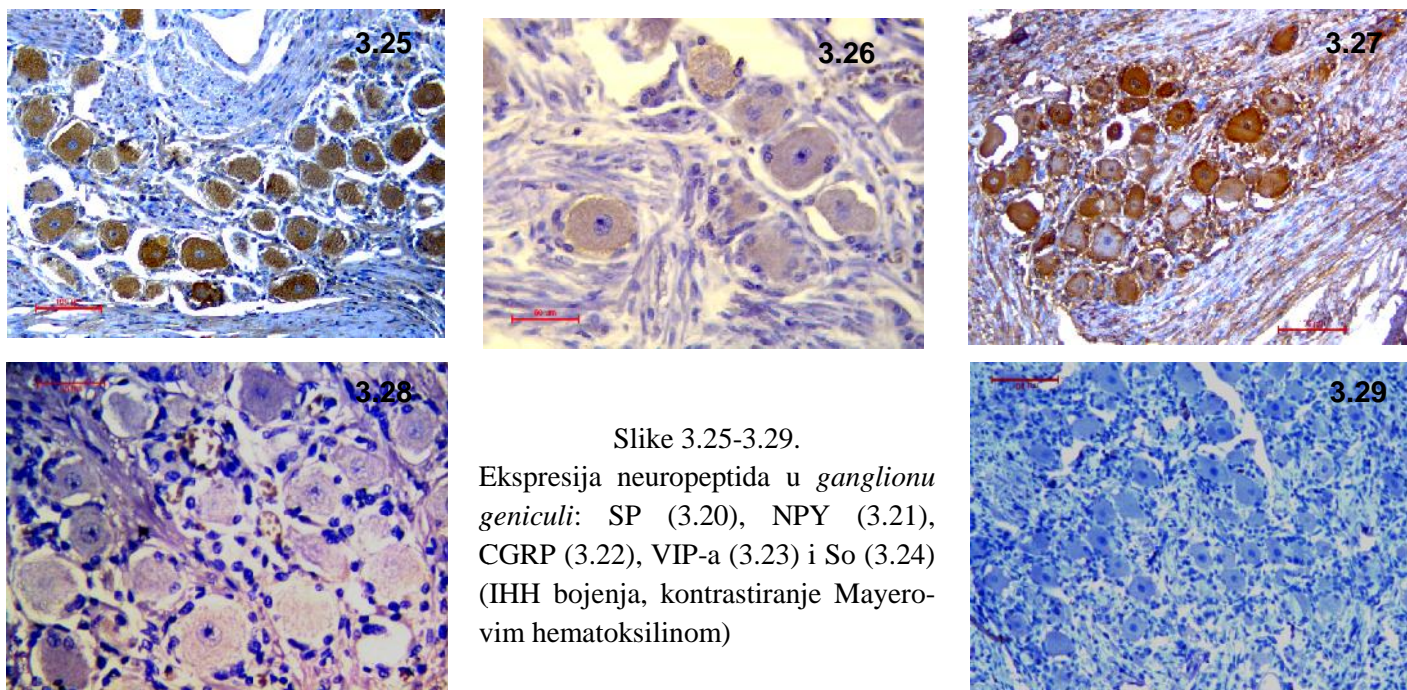
Tabela 3.1. Pregled primarnih i sekundarnih antitela koriš enih u IHH ispitivanjima

Primarni antiserum i klon	Imunogen	Proizvo a / kataloški broj	Razblaženje antitela/ Demaskiranje Ag	IHH metoda
NSE (mo anti-humani NSE) (klon BBS/NC/VI-H14)	Gama-gama enolaza iz humanog mozga	Dako A/S, Denmark M 0873	1:50 / Bez prethodnog demaskiranja antigena	Dako LSAB+/HRP
PGP9.5 (po ze ji anti-PGP9.5)	PGP9.5 izolovan iz gove eg mozga	Dako A/S, Denmark Z 5116	1:50 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
S-100 (po ze ji anti-S-100 protein)	S-100 protein izolovan iz mozga krave i dodatno pre iš en	Dako A/S, Denmark Z 0311	1:300 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
Sinaptofizin-Sy (mo mišji anti-sinaptofizin) (SY38)	Presinapsne vezikule iz gove eg mozga	Dako A/S, Denmark M 0776	1:10 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
Protein neurofilamenta-H, nefosforilisani (mo mišji anti- NFP) (SMI32)	Homogenizovani hipotalamus pacova (Fischer 344)	Calbiochem/Merck Millipore, USA NE1023	1:1000 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
NeuN (mo anti-NeuN)	Pro iš eni nukleusi neurona iz mozga miša	Millipore, USA MAB377	1:100/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
SP (po ze ji anti-human SP)	Sintetska SP	AbD Serotec, UK 8450-0004	1:100/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
CGRP (po ze ji anti-CGRP)	Pacovski CGRP	Antibodies-online GmbH, Germany ABIN115756	1:1000/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
VIP (po ze ji anti-VIP)	Sintetski VIP	AbD Serotec, UK 9535-0204	1:1000/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
Somatostatin (po ze ji anti-humani somatostatin)	Sintetski cikl ni (1-14) somatostatin	Dako A/S, Denmark A 0566	1:200 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
NPY (po ze ji anti-NPY)	Sintetski NPY svinje	AbD Serotec, UK AHP2189	1:400 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP
Glutamin-sintetaza (po ze ji anti- glutamin-sintetaza)	Sintetski peprid	Abcam, UK Ab73593	1:1000 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
Tirozin-hidroksilaza, TH (po ze ji anti-TH)	Denaturisana TH iz feohromocitoma pacova	Millipore, USA AB152	1:100 /MTP, citratni pufer pH 6, 21 min	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
Acetil-holin esteraza, AchE (po ze ji anti-AchE)	Sintetski peptid N-terminalnog dela hAchE	Abcam, UK ab78228	20µg/ml; MTP, citratni pufer pH 6, 21 min	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
Parvalbumin (mo anti-parvalbumin, Clone PARV-19)	Purifikovani parvalbumin iz miši a žabe	Sigma, USA P 3088	1:2000/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
Nurr 1 (po ze ji anti-Nurr1)	Sintetski peptid koji sadrži internu sekvencu hu-Nurr1.	Abcam, UK Ab93332	1:150/ MTP, citratni pufer pH 6, 21 min	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
CD34 (mišji mo anti-humani CD34) (klon B1-3C5)	elije KG-1a	Dako A/S, Denmark M 7168	1:25 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	DakoEnVision+/Dual Lynk System/HRP
CD117/c-Kit (po ze ji anti-humani CD117)	C-terminalni deo C-Kita (963-976 ak)	Dako, Denmark, A4502	1:500 / MTP, citratni pufer pH 6, 21 min.	Dako LSAB+/HRP

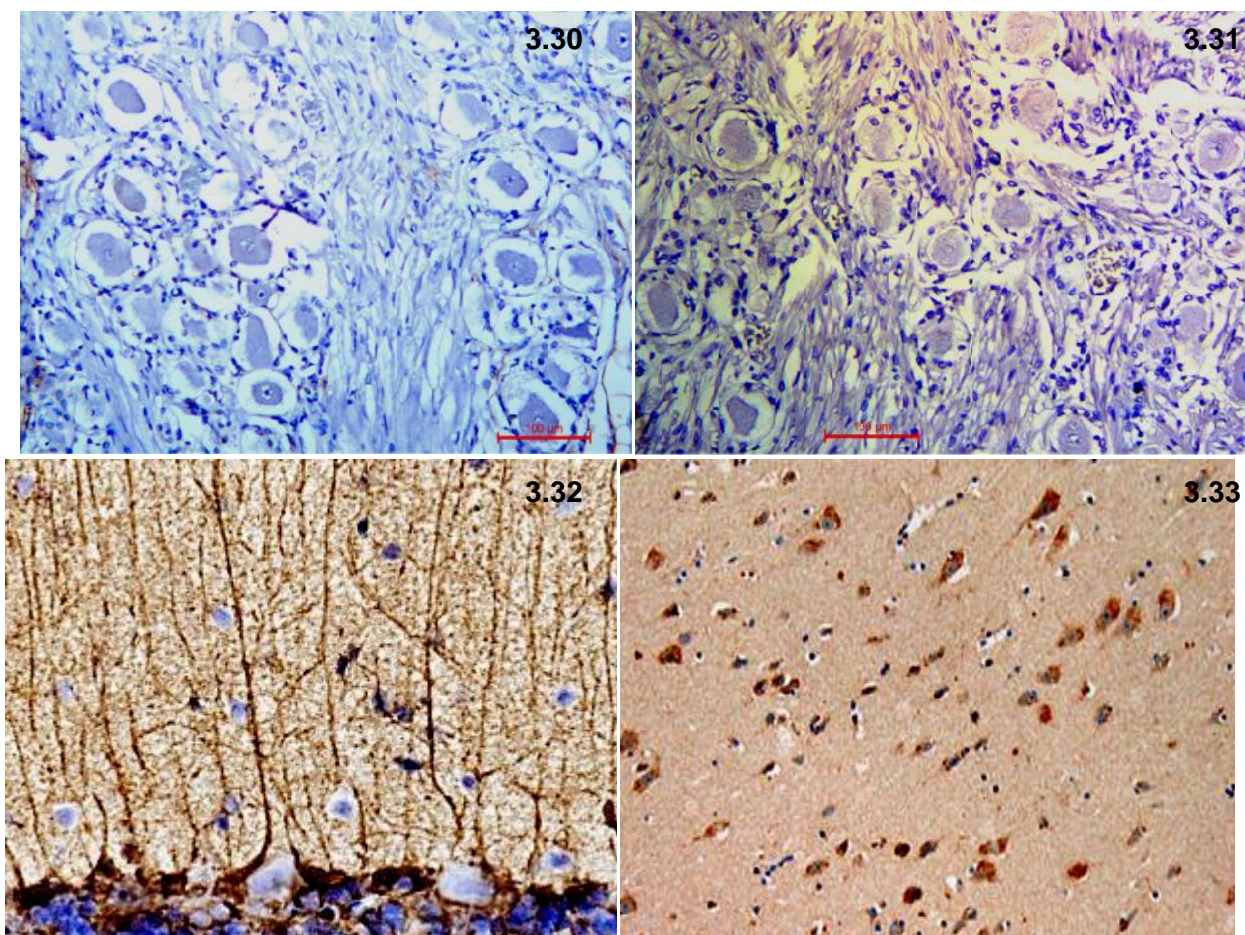
Skra enice: mo-monoklonski; po-poliklonski; MTP-mikrotalasna pe nica



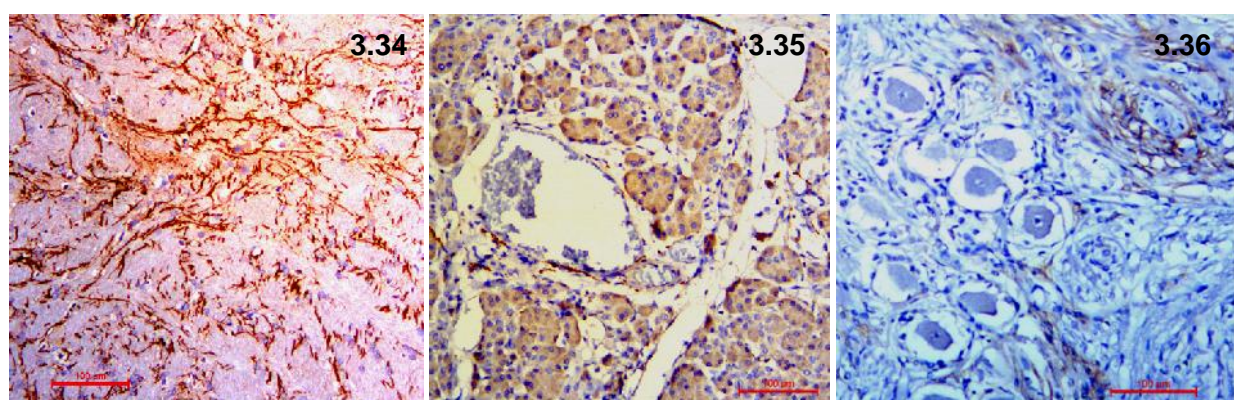
Slike 3.19-3.24. Imunohistohemijsko bojenje *ganglionu geniculi* sa pan-neuronskim markerima: NSE (3.14), PGP9.5 (3.15), S100 (3.16), Sy (3.17), NF-H (3.18) i NeuN (3.19) (IHH).



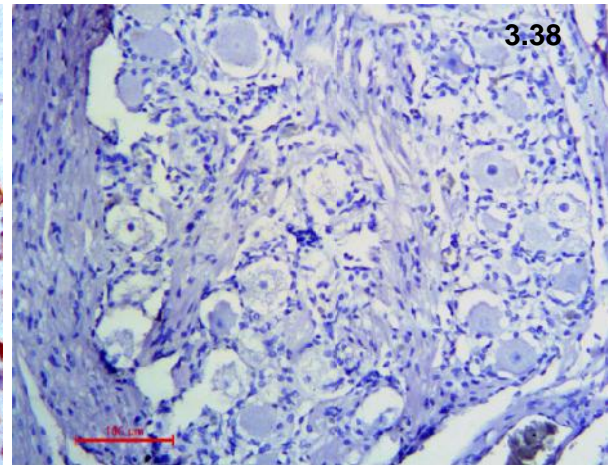
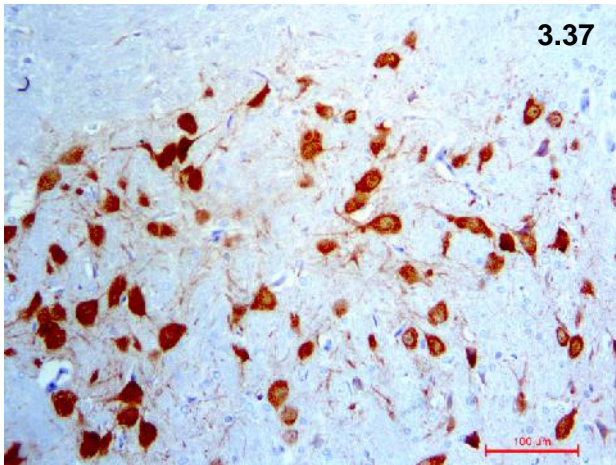
Slike 3.25-3.29. Ekspresija neuropeptida u *ganglionu geniculi*: SP (3.20), NPY (3.21), CGRP (3.22), VIP-a (3.23) i So (3.24) (IHH bojenja, kontrastiranje Mayerovim hematoksilinom)



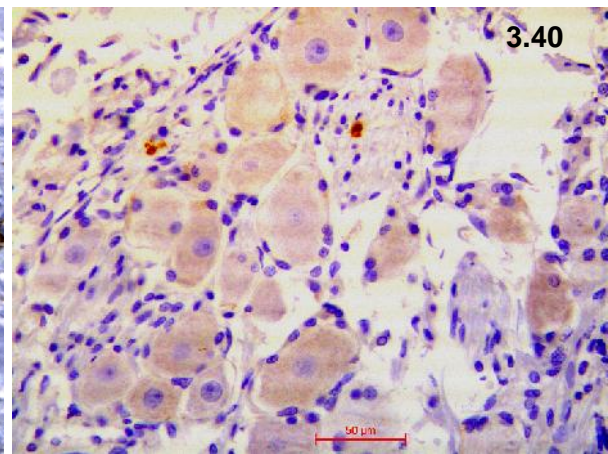
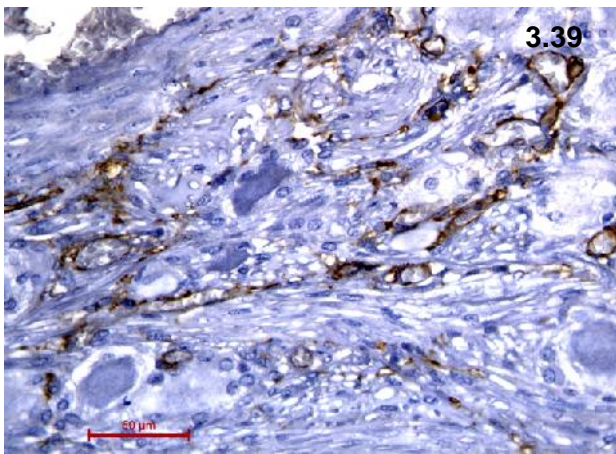
Slike 3.30-3.33. Ekspresija glutamin-sintetaze-GISy (3.30) i acetilholin-esteraze-AchE (3.31) u *ganglionu geniculi*; u drugom redu, ispod ogovaraju e slike gangliona, prikazana je ekspresija istih enzima važnih u biosintezi neurotransmitera, u kontrolnim tkivima mozga pacova - GISy (3.32, mali mozak), važne u sintezi gama-aminobuterne kiseline (GABA) i AchE (3.33, veliki mozak), važne u sintezi Ach (IHH).



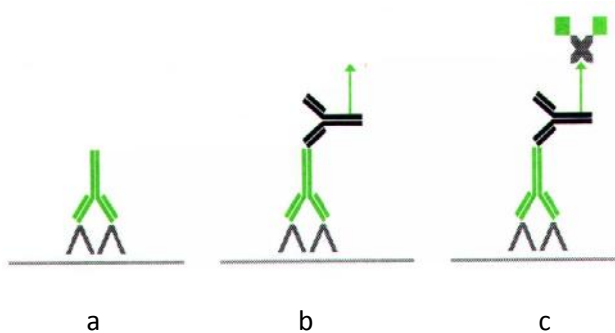
Slike 3.34-3.36. Ekspresija tirozin-hidroksilaze-TH (enzima markera dopaminergičkih i noradrenergičkih neurona) u mozgu pacova (3.34), u tkivu pankreasa oveka (3.35) i u ganglionu geniculi (3.36) (IHH).



Slike 3.37 i 3.38. Ekspresija parvalbumina u mozgu pacova (3.37) i izostanak ekspresije u *ganglionu geniculi* (3.38).



Slike 3.39 i 3.40. Ekspresija CD34 u vaskularnoj mreži (3.39) i ekspresija c-kita u mastocitima *ganglionu geniculi* (3.40)



Slika 3.41. LSAB+HRP tehnika

Prikazan je trostepeni postupak u toku primene LSAB metode. Prva stepenica (a) je inkubacija tkivnih preseka sa primarnim antiserumom (antitelima). Druga stepenica (b) je inkubacija sa biotiniziranim sekundarnim antitelom, a treća (c) sa kompleksom streptavidin-peroksidaza.

Nakon demaskiranja antigena i blokiranja aktivnosti endogene peroksidaze, tkivni preseki se inkubiraju sa odgovarajućim primarnim antitelom (mišjim, kuničjim ili kozjim), nakon čega sledi inkubacija sa biotiniziranim vezujućim antitelom i streptavidinom

obeleženi peroksidazom. Postupak se završava inkubacijom preseka u mešavini supstrata-hromogena (najčešće H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 3,3'-diaminobenzidina/DAB, ili 3-amino-9-etil-karbazola/AEC) (slika 3.36).

### **Postupak bojenja**

Kao što je već istaknuto, u toku postupka imunohistohemijskog bojenja trostepenom LSAB+ imunohistohemijskom metodom vrši se demaskiranje antigena, blokiranje endogene peroksidaze, inkubiranje preseka sa primarnim antitelom, a potom i sa biotiniziranim imunoglobulinima, streptavidinskim konjugatom sa peroksidazom rena i, konačno, inkubacija u rastvoru supstrata-hromogena.

### ***Demaskiranje antigena***

Demaskiranje antigena primenjeno je nakon uobičajenog procesa deparafinizacije i rehidratacije ispitivanih tkivnih preseka. Proces demaskiranja antigena u toku koga su preseci izlagani kuvanju u 0,01 M rastvoru citratnog pufera pH 6 (Novocastra Epitope Retrieval Solution RE7113, Novocastra, UK) u mikrotalasnoj pećnici (700 W), primenjen je pre nanošenja primarnih antiseruma. Osnovni cilj koji se postiže demaskiranjem antigena jeste obnavljanje primarne sferične konfiguracije antigena uklanjanjem neželjenih intramolekulskih veza koje nastaju usled dugotrajne formalinske fiksacije.

### ***Blokiranje endogene peroksidaze***

Nakon izvršene deparafinizacije i postupka demaskiranja antigena, blokirana je endogena peroksidaza sa 3% vodenim rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 minuta na sobnoj temperaturi.

### ***Inkubacija sa primarnim antiserumom***

Nakon demaskiranja antigena i blokiranja endogene peroksidaze tkivni preseci su inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelom u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u toku jednog sata, izuzev u slučaju bojenja na CGRP, kada su tkivni preseci u primarnom antiserumu inkubirani preko noći na temperaturi frižidera.

### ***Inkubacija sa sekundarnim antiserumom i streptavidinskim konjugatom sa peroksidazom rena; vizuelizacija reakcije antigen-antitelo***

Nakon prethodno opisanih postupaka, tkivni preseci su inkubirani sa anti-mišjim, anti-kozjim i anti-zečjim imunoglobulinima, 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, preseci su potom inkubirani sa streptavidinskim konjugatom sa peroksidazom rena, 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Kompleks antigen-antitelo vizuelizovan je primenom rastvora supstrata-hromogena (3,3'-diamino-benzidin tetrahidrohlorid i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), upotrebom DAB<sup>+</sup> kita (DAKO Liquid DAB+ Substrate/Chromogen System, Code No. K3468, Dako, Denmark) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za



rastvaranje svih primarnih antiseruma (tabela 3.1) korišten je komercijalni rastvarač (Dako Antibody diluent, Cat. No. S0809), a za ispiranje u toku različitih stepenica u proceduri imunohistohemijskog bojenja, 0,1 M fosfatni pufer pH 7,4. Na kraju su preseći kontrastirani Mayer-ovim hematoksilinom i uklapani u vodeni medijum (Aquatex-OC 261903, proizvođač *Merk*, Nemačka).

### ***Kontrola specifičnosti imunohistohemijske reakcije***

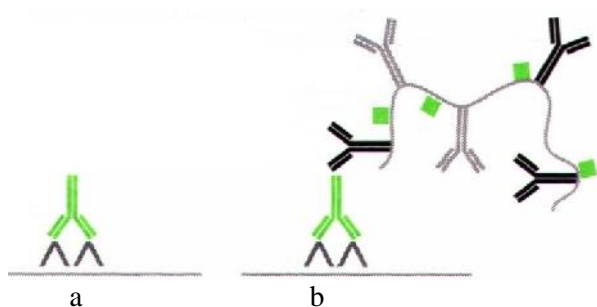
Imunohistohemijska bojenja izvršena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja primenom pozitivnih i negativnih kontrolnih postupaka, prema propozicijama UK NEQAS (engl. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*) (Rhodes and Miller, 2002).

Tokom procesa bojenja preparata gangliona, paralelno su bojene i pozitivni i negativni kontrolni uzorci za potvrdu specifičnosti i kvaliteta imunohistohemijske reakcije. Kao pozitivne kontrole služili su uzorci tkiva mozga pacova, i debelog creva i pankreasa oveka, jer sigurno sadrže ispitivane antigene koje je moguće vizuelizovati primenjenom metodom. Ovi preseći su tretirani na isti način kao i ispitivani tkivni uzorci. Negativnu kontrolu (kontrola reagensa) predstavljali su tkivni uzorci na koje je umesto primarnih antitela aplikovan neimunski serum.

### **3.6.2. EnVision+/Dual Link System/HRP**

#### **Princip metode**

Ovo je vrlo jednostavna, dvostepena imunohistohemijska metoda, vrlo visoke detekcijske moći. Ovaj sistem se zasniva na polimeru obeleženom HRP, koji je konjugovan sa sekundarnim antitelom. Sekundarni polimer ne sadrži ni avidin ni biotin. Po dvadeset molekula sekundarnih antitela i po sto molekula peroksidaze je konjugovano na jednom molekulu polimera. S obzirom na ovakvu strukturu sekundarnog sloja ova tehnika omogućava višestruku amplifikaciju signala i omogućava daleko veće razblaženje antitela nego kod primene drugih metoda, uključujući i LSAB metodu (slika 3.42).



Slika 3.42. Dako EnVision+/Dual Link System/ HRP. Prikazan je dvostepeni postupak u toku primene ove metode. Prva stepenica (a) je inkubacija tkivnih preseka sa primarnim antitelom. Druga stepenica (b) je inkubacija sa polimerom obeleženim HRP, koji je konjugovan sa sekundarnim antitelom (b).

### Postupak bojenja i kontrola specifičnosti imunohistohemijske reakcije

Nakon demaskiranja antigena, blokiranje endogene peroksidaze vrši se sa 3% vodenim rastvorom vodonik-peroksida koji u sebi sadrži levamizol, u toku 10 min. Nakon toga se na tkivne preseke nanosi primarno antitelo i inkubira u toku jednog sata, na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Nakon ispiranja, nanosi se obeležen polimer i inkubacija traje 30 min. Konačno, preparati se inkubiraju u rastvoru DAB+, kontrastiraju Mayerovim hematoksilinom i uklapaju u vodeni medijum.

Kontrola specifičnosti imunohistohemijske reakcije vršena je na identičan način kao i u slučaju primene LSAB+/HRP tehnike.

## 3.7. Morfometrijske metode ispitivanja *ganglionna geniculi*

Morfometrijske metode podrazumevale su merenja samog ganglionna, kao i ganglijskih elija i njihovih jedara sa mikroskopskih preparata. Tako određivan je i broj krvnih sudova u ganglionu i merene su njihove dimenzije. Sva merenja izvršena su na mikroskopu *Leica DMSL*, uz pomoć kamere i softverskog sistema *Leica Interactive Measurements (Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany)* (slika 4.38).

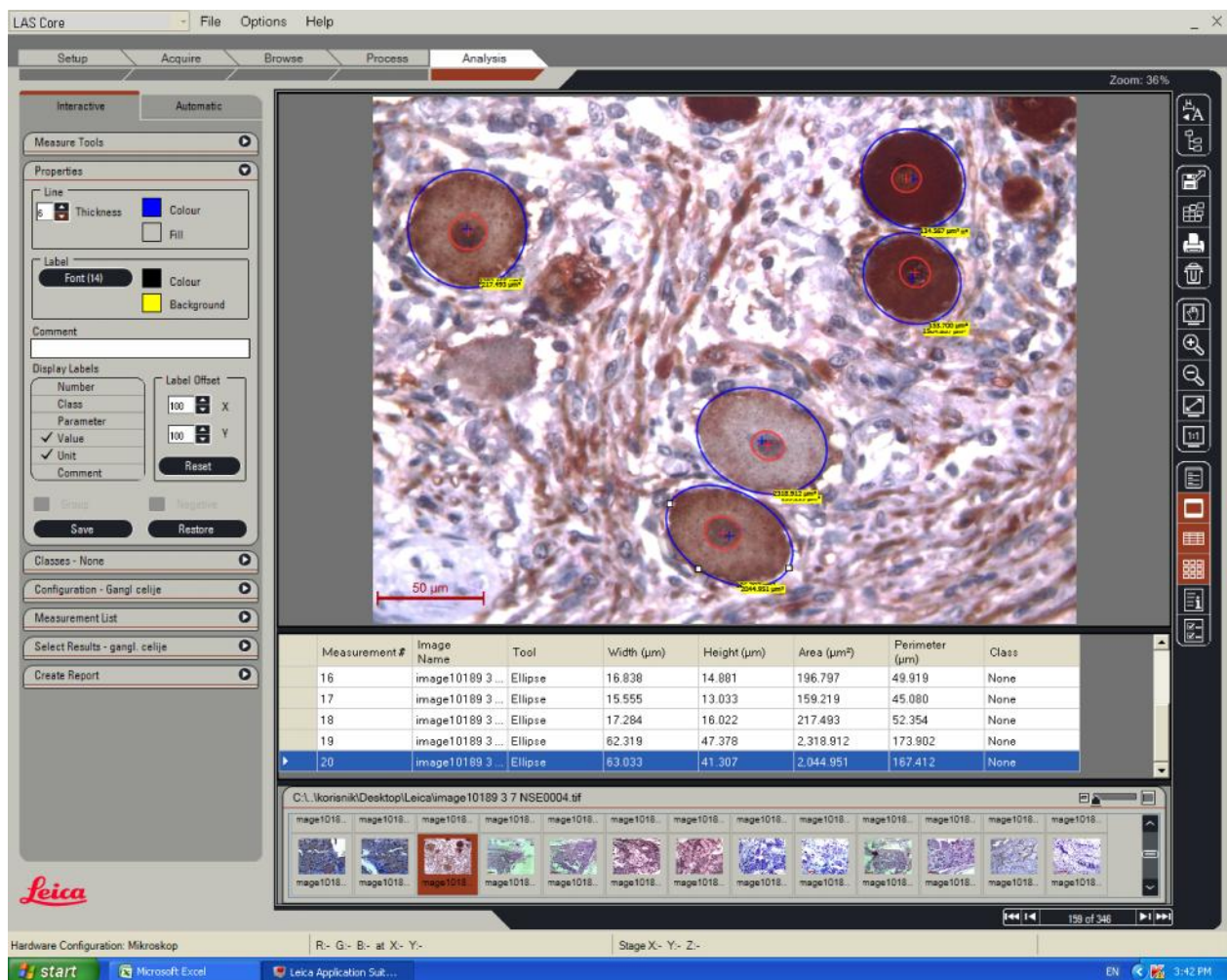
### 3.7.1. Merenje *ganglionna geniculi*

Prilikom merenja *ganglionna geniculi*, sa histoloških preparata na kojima se nalazio najviše i poprečni presek ganglionna, određivana je njegova površina, kao i obim, i dužina i kraćina prenika.

### 3.7.2. Određivanje broja ganglijskih i satelitskih elija i merenje ganglijskih elija

Na istim tkivnim presecima na kojima su određivane dimenzije ganglionona (tkivni preseki sa najvećim poprečnim presekom ganglionona), brojane su sve ganglijske elije prisutne na preseku, bez obzira da li su presečene preko jedra ili ne. Taj broj na poznatoj površini preseka ganglionona, izražavan je i kao broj ganglijskih elija po  $\text{mm}^2$  površine ganglionona.

Što se tiče dimenzija ganglijskih elija i njihovih jedara, ove morfometrijske vrednosti određivane su na 100 ganglijskih elija presečenih kroz jedro i jedarce, kao i satelitskih elija koje ih prate, izabranih na 40 vidnih polja uvećanja 20x, sa histoloških preparata 20 ispitivanih *ganglionona geniculi* (po dva slučajno izabrana vidna polja po svakom ganglionu). Određivan je i broj satelitskih elija koji okružuje ganglijske elije presečene preko nukleusa i nukleolusa. Takođe, mereni su površina, obim i kraći i duži dijametar ganglijskih elija i njihovih jedara (slika 3.38).



Slika 3.38. Prikaz morfometrijske analize ganglijskih elija uz pomoć softverskog sistema (Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany)

### **3.7.3. Određivanje broja SP, CGRP i NF-H imunoreaktivnih ganglijskih elija i njihovih morfometrijskih karakteristika**

Sa preparata obojenih IHH metodama na SP, CGRP i NF-H, određivani su broj pozitivno obojenih i broj neobojenih elija na celom preseku ganglionu, i izražavani u procentima. Obojene elije svrstavane su u tri grupe – kao slabo obojene, umereno obojene i jako obojene.

U okviru svakog od ispitivanih peptida – SP, CGRP i NF-H, određen broj obojenih i neobojenih elija presečenih preko jedra (oko 100 elija), morfometrijski je obrađivan (način kako je to rađeno i na preparatima obojenim H&E), da bi se ustanovilo da li postoje morfometrijske razlike između elija koje ekspresiraju navedene peptide i onih koje ih ne ekspresiraju kao i razlike između elija koje ekspresiraju različite peptide.

### **3.7.4. Određivanje broja i merenje dimenzije krvnih sudova**

Broj krvnih sudova u okviru mikrovaskulature genikulatnog ganglionu određivan je na mikroskopskom uveličanju x400, na 56 polja merenja sa 12 preparata, veličine polja 341,7 µm x 250,0 µm. Takođe, brojana su tela ganglijskih elija na istom uveličanju i u istim poljima, i ove vrednosti su poslužile da se dobije prosečan odnos ganglijskih elija prema krvnim sudovima.

## **3.8. Semikvantitativna procena veličine ekstracelularnog (interganglijskog) prostora kao i prostora koji zauzimaju ganglijske elije**

Kod semikvantitativne procene veličine ekstracelularnog prostora u *ganglionu geniculi* primenjen je sledeći sistem bodovanja: 1+ (do 20% površine preseka ganglionu), 2+ (21-30% površine preseka) i 3+ (30-50% površine preseka ganglionu).

Istovremeno je procenjivana i površina koju zauzimaju ganglijske elije u okviru svakog ispitivanog ganglionu, a sistem bodovanja je bio sledeći: 1+ (50-70% površine preseka ganglionu), 2+ (71-80% površine preseka ganglionu) i 3+ (preko 80% površine preseka ganglionu).

### **3.9. Semikvantitativna procena ekspresije imunohistohemijskih markera i odre ivanje broja ganglijskih elija u ganglionu geniculi koje eksprimiraju SP, CGRP i NF-H**

Imunohistohemijska ekspresija SP, CGRP i NF-H procenjivana je semikvantitativno, u bod sistemu od: 0 (nema bojenje), 1+ (slabo imunohistohemijsko bojenje), 2+ (umereno imunohistohemijsko bojenje) i 3+ (jako imunohistohemijsko bojenje).

### **3.10. Statisti ka obrada rezultata**

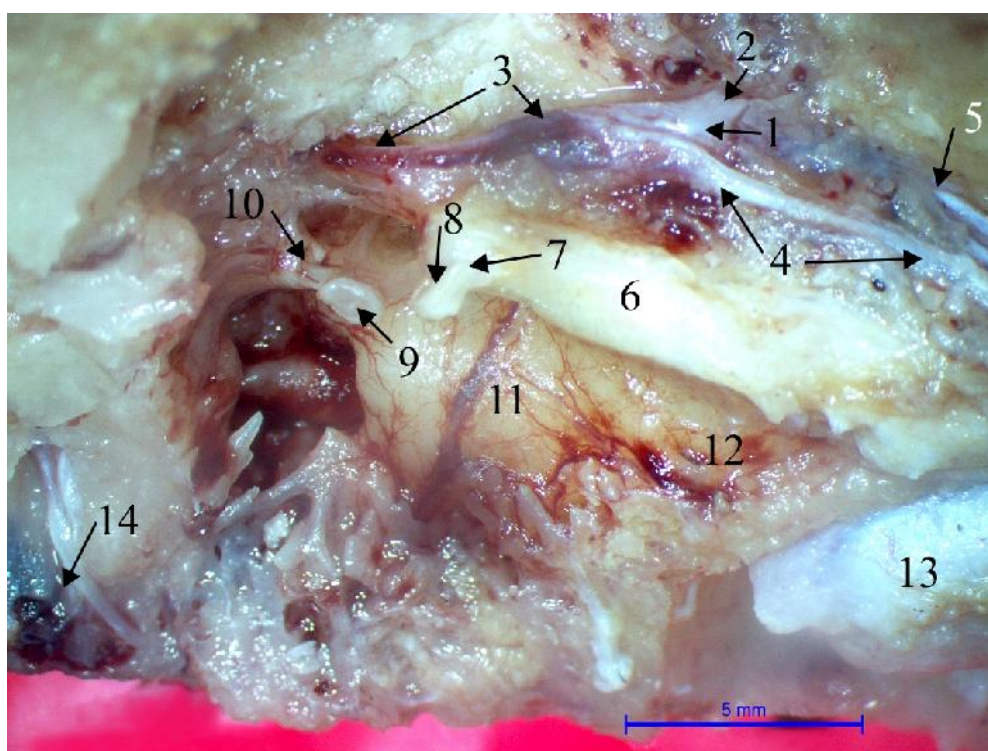
Statisti ka analiza dobijenih rezultata ura ena je u statisti kom paketu PrismaPad 4.00. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Minimalni nivo statisti ke zna ajnosti je ustanovljen na  $p < 0,05$ . U statisti koj analizi koristili smo deskriptivne statisti ke parametre: aritmeti ku sredinu, standardnu devijaciju, standardnu grešku, interval varijacije i koeficijent varijacije. Statisti ka zna ajnost izme u ispitivanih eksperimentalnih grupa odre ivana je koriš enjem ANOVA testa, Studentovog t-testa, *Robust Tests of Equality of Means (Welch)*, Bonferronijevoh testa, Dunettovog T3 testa, *Pearsonovog Chi-Square* testa i testa linearne povezanosti. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno, grafi ki ili putem histiograma.

Sve morfometrijske i stereološke analize dobijene kompjuterizovanim programom (*Leica Interactive Measurements, Leica Microsystems GmbH, Frangfurt, Germany*), obra ene su statisti kim programom po Kolmogorov-Smirnov testu, gde je homogenost varijansi procenjena F-testom. Studentovim t testom upore ene su srednje vrednosti. Minimalni nivo statisti ke zna ajnosti ustanovljen je na  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Mikroanatomske topografske karakteristije ganglionu geniculi

Disekciona morfometrijska studija 10 petroznih delova temporalnih kostiju je pokazala da je predeo kolena facijalnog nerva, regija gde smo histohemijskom studijom pokazali da u 19 (95%) od 20 slu ajeva postoji kolekcija ganglijskih elija koju označavamo kao GG, na 2 (20%) preparata direktno u kontaktu sa durom. Razlog je nedostatak koštanog pokrivača ganglionu, odnosno postojao je proširenje i uvećanje zjap kanala velikog petroznog nerva. Analiza mernih karakteristika rastojanja od GG vršena je direktnim merenjem na kompletno disekovanim preparatima (slika 4.1).



Slika 4.1. Mikrodisekcionni preparat desnog petroznog dela temporalne kosti po odsecanju lateralnog dela: 1) *ganglion geniculi*, 2) labirintni deo facijalnog nerva, 3) timpanični deo facijalnog nerva, 4) *n. petrosus major*, 5) *foramen a. petrosae*, 6) *semicanalis m. tensoris tympani*, 7) *processus cochleariformis*, 8) tetiva mišića zatezača bubne opne, 9) *caput stapedis*, 10) *eminentia pyramidalis*, vrh, 11) *promontorium*, 12) *tuba auditiva*, 13) *a. carotis interna*, 14) *foramen stylomastoideum*.

Rezultati naših merenja prikazani su u tabeli 4.1. Navodimo minimalne, maksimalne i prose ne vrednosti, kao i standardne varijacije i standardne greške svih rastojanja koja su bila predmet merenja.

Tabela 4.1. Morfometrijska studija položaja gangliona genikuli

Rastojanje	Parametar merenja	Min. ( $\mu\text{m}$ )	Max. ( $\mu\text{m}$ )	<b>X (mm)</b>	SD ( $\pm \mu\text{m}$ )	SE ( $\pm \mu\text{m}$ )
1.	GG-ACI	9117,77	10636,762	<b>9867,06</b>	485,26	153,45
2.	GG-ProcCoch	4817,854	6067,988	<b>5533,95</b>	430,07	136
3.	GG-CapStap	7173,267	8535,169	<b>7950,18</b>	451,92	142,91
4.	GG-NPM	823,132	1697,446	<b>1240,93</b>	298,39	94,36
5.	GG-Prom	7014,729	8215,455	<b>7631,36</b>	399,53	126,34
6.	GG-FS	16241,291	17471,811	<b>16919,9</b>	409,78	129,58
7.	GG-EmPyr	7931,65	9362,035	<b>8768,63</b>	485,12	153,41
8.	GG-ForAP	4702,539	6308,678	<b>5395,13</b>	516,68	163,39

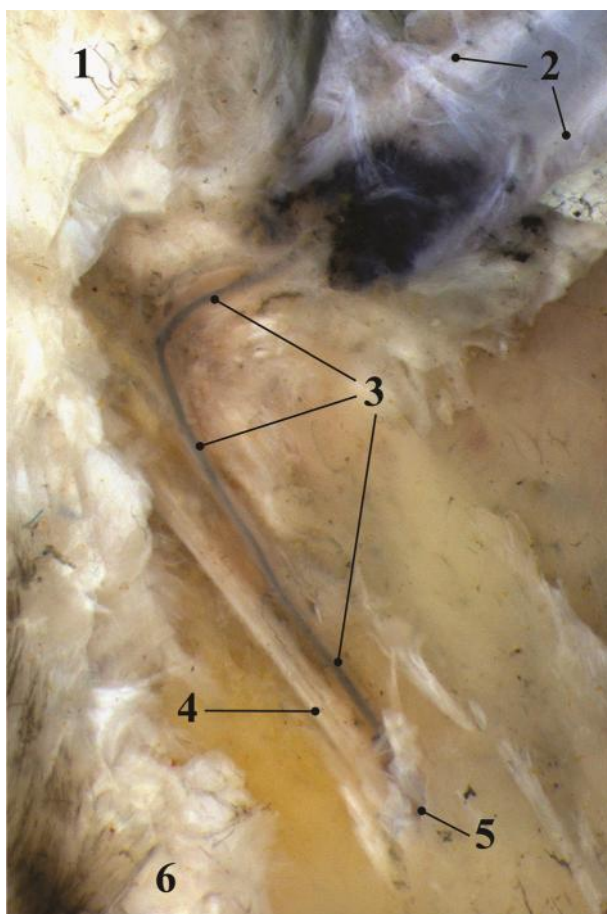
GG=ganglion geniculi; ACI=a. carotis interna; ProcCoch=processus cochleariformis; CapStap=caput stapedis; NPM=n. petrosus major; Prom=promontorium; FS=foramen stylomastoideum; EmPyr=eminentia pyramidalis; ForAP=foramen a. petrosae

Rastojanje od GG do mesta najkonveksnijeg dela krivine spoljašnjeg obima petroznog segmenta unutrašnje karotidne arterije u karotidnom kanalu iznosilo je od 9,12 do 10,64 mm, prose no 9,87 mm. Rastojanje od GG do centralnog dela vrha kohleariformnog nastavka, na mestu izlaska tetive miši a zateza a bubne opne, bilo je od 4,82 do 6,07 mm, prose no 5,53 mm. Distanca od GG do centralne ta ke glave nakovanja varirala je od 7,17 do 8,54 mm, prose no 7,95 mm. Rastojanje od GG do mesta odvajanja velikog petroznog nerva od stabla timpani nog dela facijalnog nerva bilo je od 0,82 do 1,70 mm, prose no 1,24 mm. Distanca od GG do najispup enije centralne ta ke promontorijuma iznosila je od 7,01 do 8,22 mm, prose no 7,63 mm. Rastojanje od GG do stilomastoidnog otvora variralo je od 16,24 do 17,47 mm, prose no 16,92 mm. Rastojanje od GG do središnjeg dela vrha piramidalnog uzvišenja na mestu izlaska tetive miši a uzengije bilo je od 7,93 do 9,36 mm, prose no 8,77 mm. Rastojanje od GG do ulaznog otvora petrozne arterije u košanu piramidu iznosilo je od 4,7 do 6,31 mm, prose no 5,4 mm.

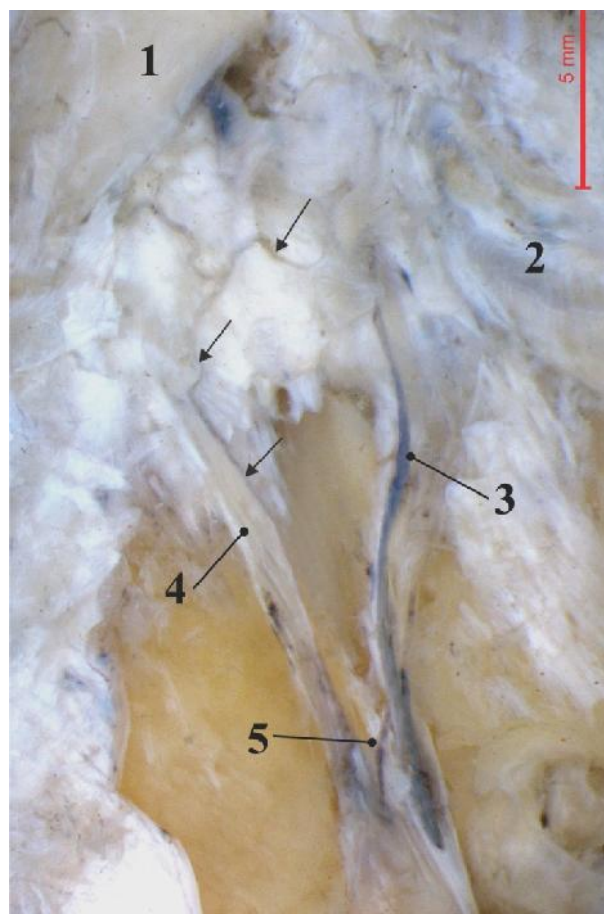
## 4.2. Vaskularizacija ganglionu geniculi

### 4.2.1. Periganglijski krvni sudovi

Ova studija je pokazala da *ganglion geniculi* (GG) vaskularizuje *a. petrosa* (AP), koja je bila prisutna na svim preparatima (100%). Najčešće, u 11 (91,67%) slučajeva, postojala je samo jedna arterija namenjena GG, dok smo samo na 1 (8,33%) preparatu uočili i drugu petroznu arteriju poreklom iz arterijskog spleta trigeminalnog gangliona (slike 4.1 i 4.2).



Slika 4.2. Pogled odozgo na desni petrozni deo temporalne kosti: 1) trigeminalni ganglion, 2) AMM, 3) AP koja prati *n. petrosus major* (4), do njegovog hijatusa (5), 6) dura delimitirana no uklonjena (tuš-želatini).



Slika 4.3. Petrozna arterija (strelice) poreklom iz arterije trigeminalnog gangliona (1), kao i AMM (2) koja daje svoju AP (3) prati *n. petrosus major* (4) i daje granicu za njega (5) (tuš-želatini).

AP je uvek polazila od stabla AMM, na našim preparatima normalno razvijene, neposredno po njenom ulasku kroz spinozni otvor u srednju lobanjsku jamu. Merenja su pokazala da je spoljašnji prečnik AMM varirao od 0,5 do 1,9 mm, i da je prosečno iznosio 1,3 mm. Mesto odvajanja AP od intrakranijalnog segmenta AMM je bilo uvek neposredno iznad



*foramena spinosuma*, upolje od *n. petrosus minor* i *major*, kao i od trigeminalnog ganglion (slike 4.2 i 4.3).

AP je mala arterija spoljašnjeg dijametra 0,29-0,56 (prose no 0,44 mm), dok je njen unutrašnji prenik iznosio 0,11-0,52 (prose no 0,24 mm) (tabela 4.2). Po odvajanju od AMM, AP se pružala unazad i nešto upolje, pod ostrim uglom na *n. petrosus major* (NPM). Prenici NPM su iznosili od 0,20 mm do 0,44 mm (prose no, 0,31 mm). AP je najčešće, u 10 slučajeva (83,3%), prilazila proksimalnom delu NPM, neposredno ispred njegovog hijatusa (slika 4.3). U tim slučajevima najkraće rastojanje od početnog dela arterije do distalnog segmenta nerva prosečno je iznosilo 3,6 mm (2,6-4,4 mm) (tabela 4.2). Završni deo ili čak veći deo arterije ponekad je pod durom bio prekriven i tananom koštanom pločicom. Na 2 (16,7%) preparata AP je prilazila distalnom delu NPM, u blizini trigeminalnog ganglion (slika 4.2). U tim slučajevima arterija je pratila mali petrozni nerv i ulazila kroz njegov hijatus u šupljinu facijalnog kanala. AP je prosečno bila duga 17,1 mm (od 12,4 do 25,9) (tabela 4.2).

Na jednom preparatu (8,33%) postojale su dve petrozne arterije. Jedna je bila tipičnog porekla iz AMM i prilazila je proksimalnom delu NPM. Druga petrozna arterija je polazila iz trigeminalnog vaskularnog spleta, od trigeminalne arterije takođe poreklom iz AMM. Opisana trigeminalna arterija pružala se duž posterolateralnog dela trigeminalnog ganglion i od nje se odvajala petrozna grana. Ova petrozna grana se pružala duž NPM i davala male grane kako za nerv tako i za genikulatni ganglion (slika 4.3).

Tabela 4.2. Morfometrijska studija petrozne arterije.

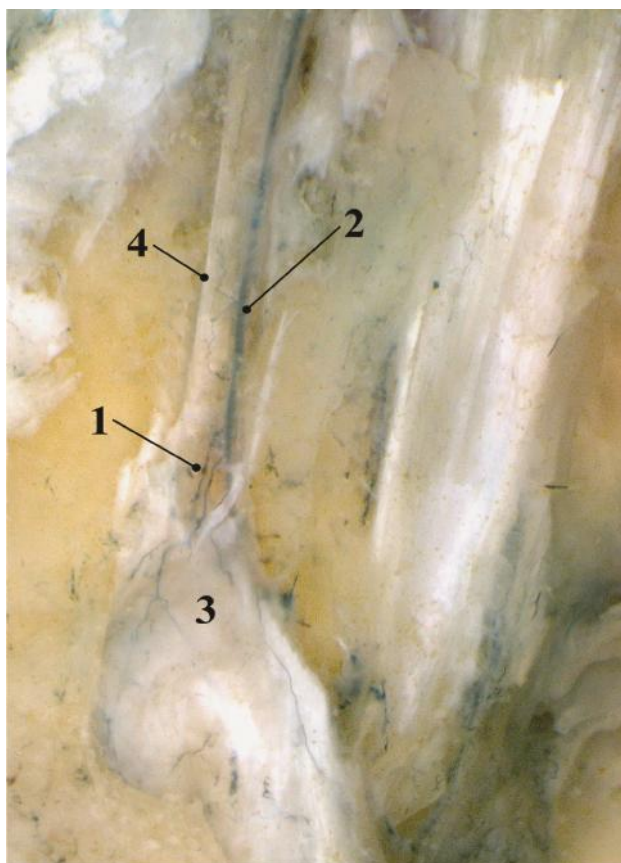
Broj arterija (prose no)	Spoljašnji prenik (prose no), mm	Unutrašnji prenik (prose no), mm	Dužina (prose no), mm	Rastojanje do NPM (prose no), mm
1-2 (1,1)	0,29-0,56 (0,44)	0,11-0,52 (0,24)	12,4-25,9 (17,1)	2,6-4,4 (3,6)

AP je, bez obzira na poreklo ili na način pristupanja stablu NPM, njegovom proksimalnom ili distalnom delu, uvek davala 1 do 3 granice (prosečno 1,6) namenjene vaskularizaciji nerva (Slika 4.4.). Na samom nervu arterijske granice su bile usmerene prema njegovom distalnom i prema proksimalnom kraju. Njihovi spoljašnji prenici su iznosili od 0,012 do 0,052 mm (prosečno 0,024 mm, odnosno 24  $\mu$ m).

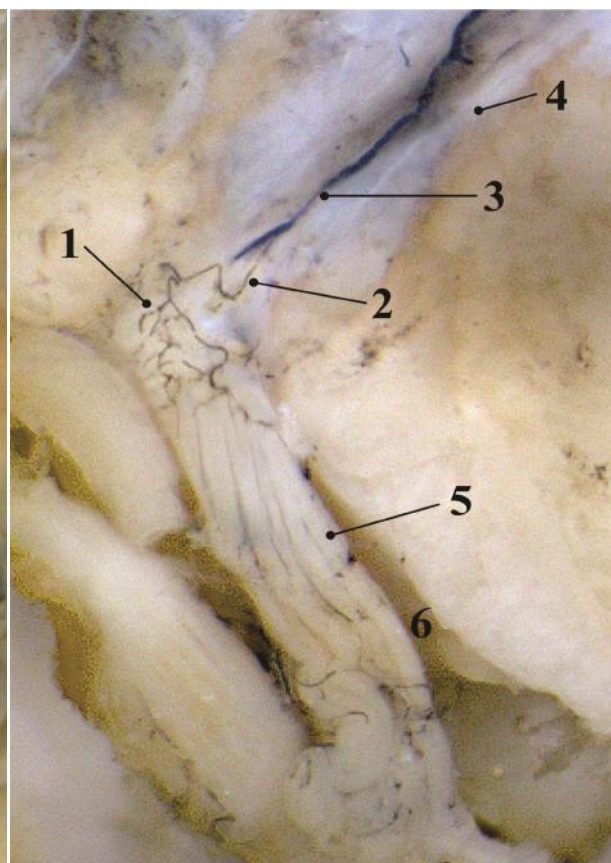
#### 4.2.2. Intraganglijska vaskularna mreža

Pra enjem završnog segmenta petrozne arterije ustanovili smo da u 25% slu ajeva arterija na svom putu ka genikulatnom ganglionu ulazi u facijalni kanal kroz *hiatus canalis nervi petrosi majoris* prate i NPM. Me utim, na ve ini preparata (75%) AP je prolazila kroz poseban koštani otvor i na krovu bubne duplje, koji se nalazio anterolateralno u odnosu na ganglion. U svim slu ajevima svaka AP se pružala ispod ili neposredno upolje od samog gangliona, a zatim je nastavljala duž timpani nog segmenta facijalnog nerva.

Ova istraživanja su pokazala da je AP u neposrednoj blizini genikulatnog gangliona daje 1 gran icu u 1 slu aju (8,33%), 2 arterijice na 9 preparata (75%) ili 3 suda na 2 piramide (16,67%), namenjene vaskularizaciji samog gangliona (slika 5.3). Merenjem smo ustanovili spoljašnje pre nike ovih gran ica, od 0,018 mm do 0,056 mm (prose no 0,029 mm). Ubrzo po odvajanju od stabla petrozne arterije ove arterijice su se granale i formirale arterijsku mrežu na površini gangliona iz koje su polazili sudovi za samo tkivo gangliona (slike 4.4 i 4.5).

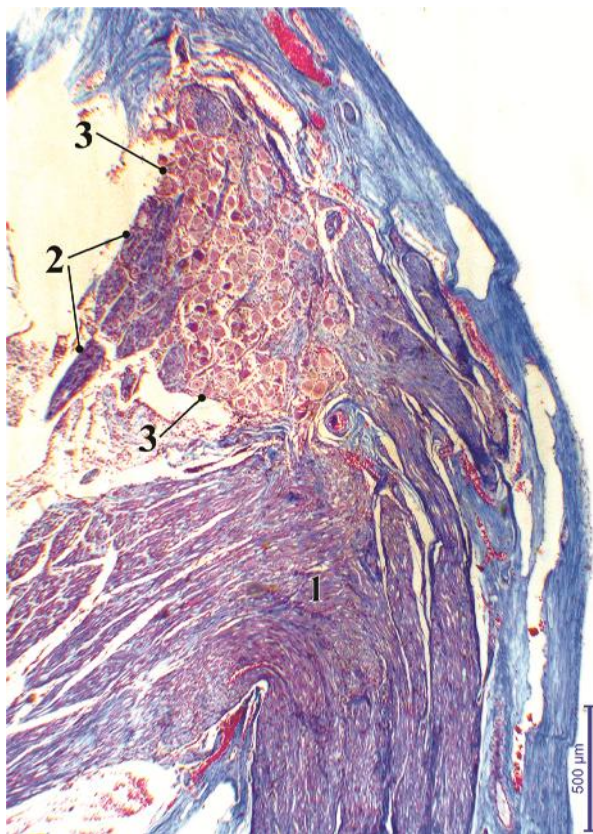


Slika 4.4. Dve granice (1) petrozne arterije (2) vaskularizuju genikulatni ganglion (3), 4) n. petrosus major (tuš-želatin).

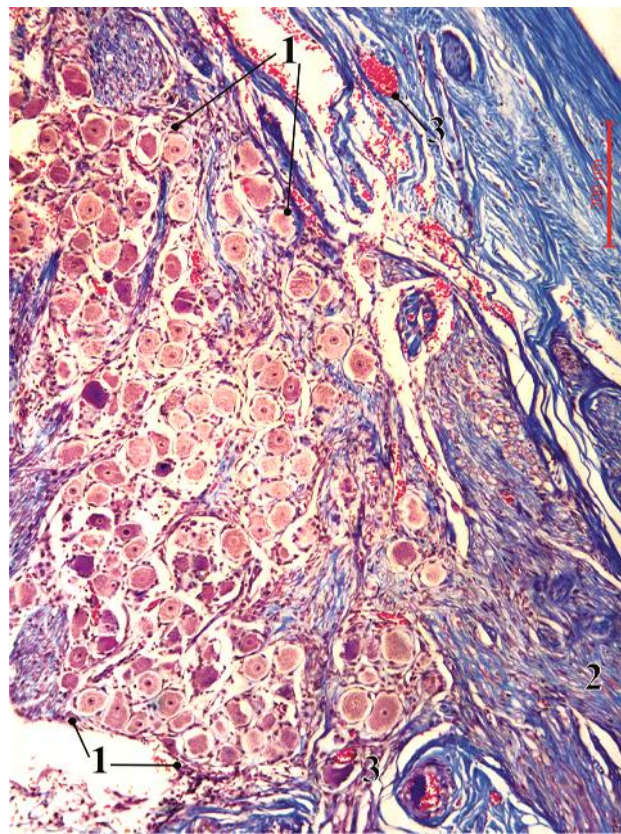


Slika 4.5. Površinska vaskularna mreža genikulatnog gangliona (1) nastaje od granice (2) leve AP (3), 4) NPM, 5) facijalni nerv, 6) otvoren unutrašnji slušni hodnik (tuš-želatin).

Prilikom proučavanja intraganglijskih sudova korišćenjem mikroskopa, prvo su analizirani histološki preparati obojenih trihromnom metodom po Massonu, čime je bilo moguće lako uočiti brojne manje i veće krvne sudove ispunjene eritrocitima (slike 4.6 i 4.7).



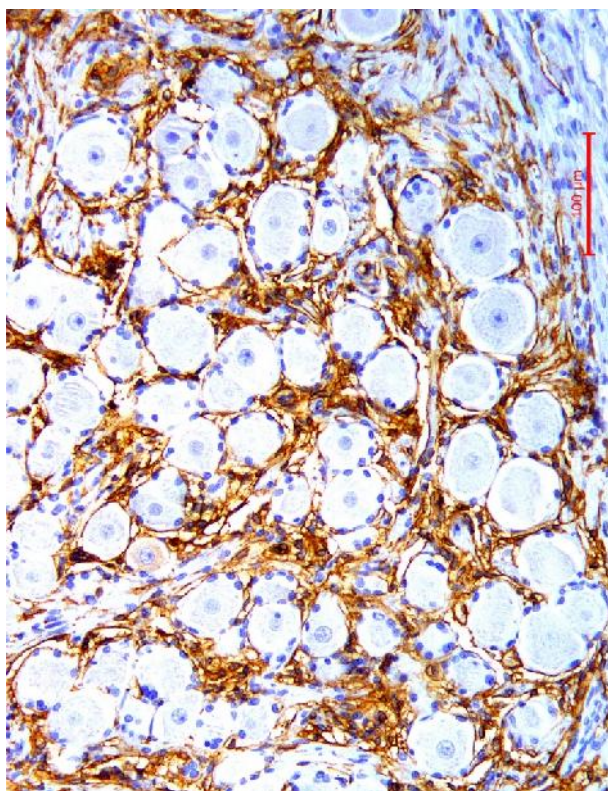
Slika 4.6. Fotomikrografija kolena (1) facijalnog nerva, *n. intermediusa* (2) i GG (3). Krvni sudovi su ispunjeni eritrocitima (trihromno bojenje po Massonu).



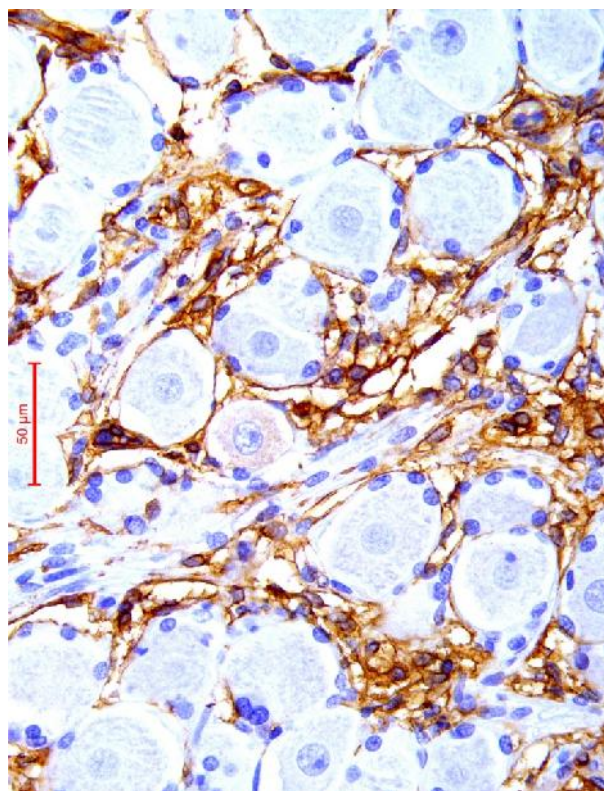
Slika 4.7. Veće uvećanje preparata sa prethodne slike, 1) GG, 2) facijalni nerv, 3) ve i krvni sudovi ispunjeni eritrocitima (trihromno bojenje po Massonu).

Međutim, tek je imunohistohemijska (IHH) metoda bojenja na marker endotelnih ćelija CD34 pokazala svo bogatstvo vaskularne mreže intraganglijskih sudova (slike 4.8 i 4.9). Mali krvni sudovi, kapilari i prekapilari, pružali su se duž i oko malih grupa ganglijskih ćelija. Samo kapilari su posebno okruživali svaku ganglijsku ćeliju. Krvni sudovi su sporadično pokazivali lokalna proširenja. Na histološkim preparatima obojenim IHH na CD34 sprovedena su, na način opisan u poglavlju “Materijal i metode”, morfometrijska istraživanja koja su pokazala da je u intraganglijskoj vaskularnoj mreži prosečan broj krvnih sudova  $99,8/85.425 \mu\text{m}^2$ , a prosečan broj krvnih sudova na  $\text{mm}^2$  površine ganglionu iznosi 1168,28 (od 1018 do 1674).

Njihov pre nik se kretao od 5,47  $\mu\text{m}$  do 8,71  $\mu\text{m}$  (prose no 6,84 $\pm$ 0,56, SE=0,056). Svaka ganglijska elija, na nivou preseka kroz jedro gde je najšira, okružena je prose no sa 3,6 mikrosudova (tabela 4.3).



Slika 4.8. Mikrovaskularna mreža genikulatnog gangliona na srednjem uve anju (x200, IHH CD34).



Slika 4.9. Mikrovaskularna mreža genikulatnog gangliona na ve em uve anju. Vide se brojne ganglijske elije okružene satelitskim elijama i kapilarna mreža oko njih (x400, IHH CD34).

Tabela 4.3. Morfometrijska studija intraganglijske vaskularizacije.

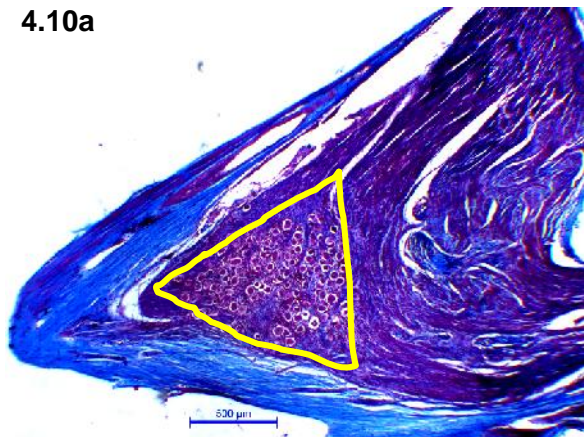
Broj arterija za ganglion frekvenca (%)			Spoljašnji pre nik arterija ( $\mu\text{m}$ ) (prose no)	Mikrosudovi gangliona polje merenja 341,7 x 250,0 $\mu\text{m}$			Ganglijske elije: krvni sudovi
				Broj (prose no)		Pre nik ( $\mu\text{m}$ ) ( $X\pm SD$ )	
				u polju merenja	izraženo na $\text{mm}^2$		
1	2	3	18-56 (29)	87-143 (99,8)	1.018-1.674 (1.168,28)	5,47-8,71 (6,84 $\pm$ 0,56)	27,4: 99,8 1:3,6
1 (8,33)	9 (75)	2 (16,67)					

### 4.3. Morfološke karakteristike *ganglionna geniculi*

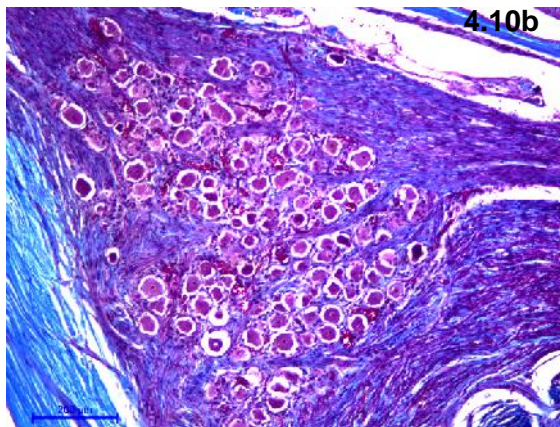
#### 4.3.1. Položaj, izgled i veličina ganglionna

Svih 20 ispitivanih ganglionna bili su *lokalizovani* na tipičnom mestu, neposredno pre kolena n. facialis, osim jednog koji je imao 15 ostrvaca elija u labirintnom delu facijalisa, zna i neposredno pre kolena.

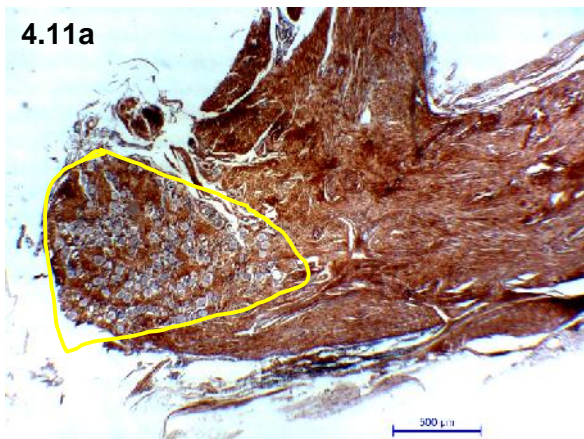
4.10a



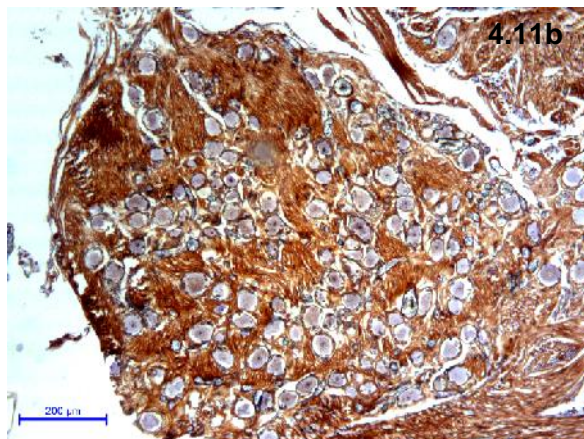
4.10b



4.11a

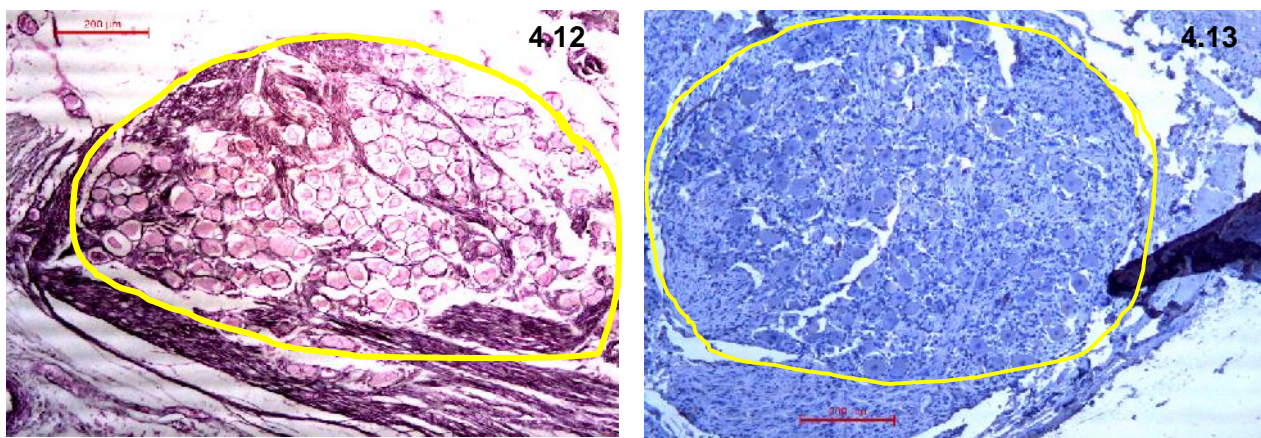


4.11b



Slike 4.10 i 4.11. Izgled na poprečnom preseku tipičnog trouglastog jednakostranog i zaobljenog trouglastog ganglionna *geniculi* (4.10a i 4.10b) i zaobljenog trouglastog ganglionna (4.11a i 4.11b). Trihromno bojenje po Massonu sa anilin-plavim (4.10) i bojenje na retikulinska vlakna po Gordon-Sweetu (4.11).

Što se tiče *oblika ganglionna geniculi* na preseku, najveći broj ganglionna je bio trouglast – 14/20 (70%), zatim su po uestalosti sledili ovalni ganglioni – 5/20 (25%), dok je samo jedan ganglion (5%) bio sastavljen od grupica razbacanih ganglijskih elija u labirintnom delu facijalisa (slike 4.10-4.13). Trouglasti ganglioni imali su izgled sličan jednakostranim ili jednakokrakim trouglovima (6/20; 30%) ili su bili “zaobljeno” trouglasti (8/20, 40%).



Slike 4.12 i 4.13. Izgled “ovalnih” gangliona na poprečnom preseku. Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastična vlakna i vezivo (4.12), i bojenje Mayerovim hematoksilinom (4.13).

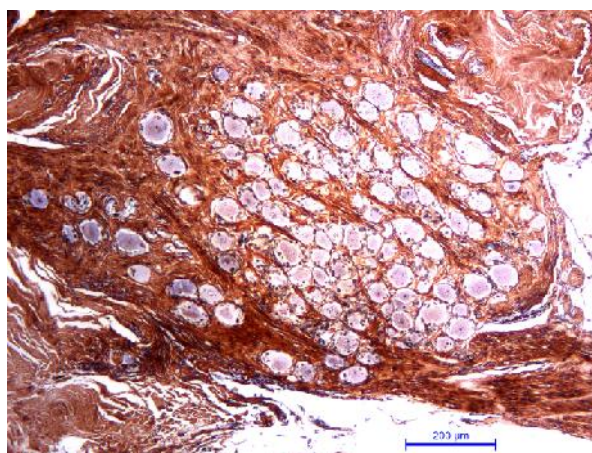
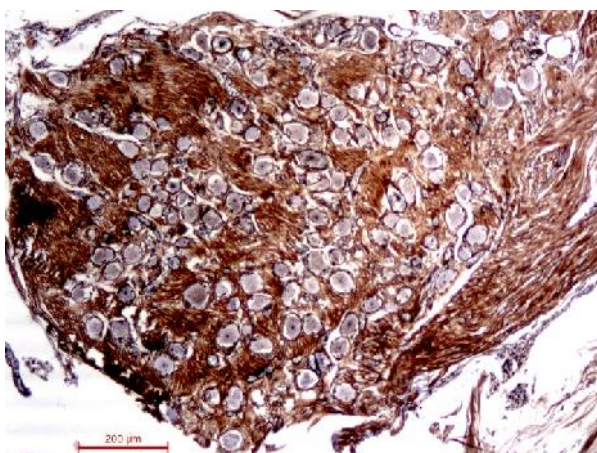
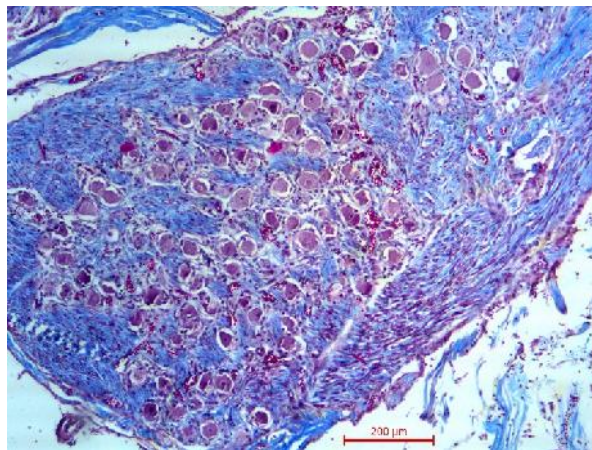
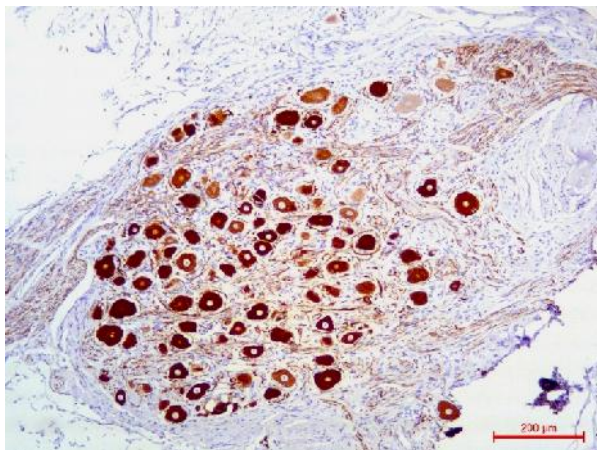
Tabela 4.4. Merne karakteristike genikulatnih gangliona

	X (~m)	SD (± ~m)	SE (± ~m)	Min (~m)	Max (~m)
<b>R2</b>	910,008	125,67	28,83	704,761	1076,128
<b>R1</b>	1187,957	139,4	31,98	1048,420	1548,570
<b>RX</b>	1048,983	91,54	21,00	915,788	1297,776
<b>Obim</b>	4094,286	685,14	157,18	3183,690	5923,146
	X (~m <sup>2</sup> )	SD (± ~m <sup>2</sup> )	SE (± ~m <sup>2</sup> )	Min (~m <sup>2</sup> )	Max (~m <sup>2</sup> )
<b>Površina</b>	648066,112	25182,97	1126,00	418964,214	926303,344

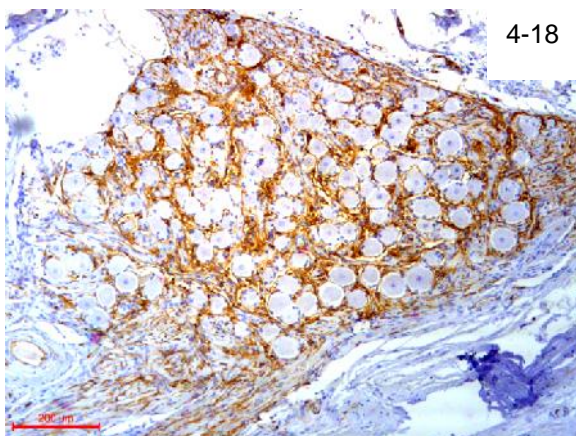
Merne karakteristike *gangliona geniculi* prikazane su u tabeli 4.4. Prosečna vrednost dužeg prečnika gangliona iznosila je  $1187,957 \pm 31,98 \mu\text{m}$  ( $X \pm SE$ ) (od 1048,420 do 1548,570), krajeg  $910,008 \pm 28,83 \mu\text{m}$  (od 704,761 do 1076,128), kod je površina preseka gangliona iznosila  $648,066,112 \pm 1126 \mu\text{m}^2$  (od 418964 do 926303). Prosečan obim gangliona bio je  $4094,286 \pm 157,18 \mu\text{m}$  (od 3183,690 do 5923,146). Pojednostavljeno, prečnik gangliona geniculi je oko 1 mm, a njegova površina preseka ispod  $1 \text{ mm}^2$ , dok je obim gangliona oko 4 mm.

#### 4.3.2. Histološka organizacija gangliona geniculi

Pažljivi pregled preparata obojenih hematoksilin-eozinom i različitim histohemijskim metodama bojenja, omogućio je detaljan uvid u histološku organizaciju genikulatnog gangliona.



Slike 4.14-4.17. Slike prikazuju različitu širinu intercelularnog prostora u *ganglionu geniculi* – intercelularni prostor zauzima između 31 i 50% (gore levo), od 21-30% (gore desno), i manje od 20% površine preseka ganglionna (dole). IHH na NF200kDa (gore levo), trihromsko bojenje po Massonu sa anilinskim plavim (gore desno), bojenje po Van Gisonu na elastična vlakna i vezivo (dole).

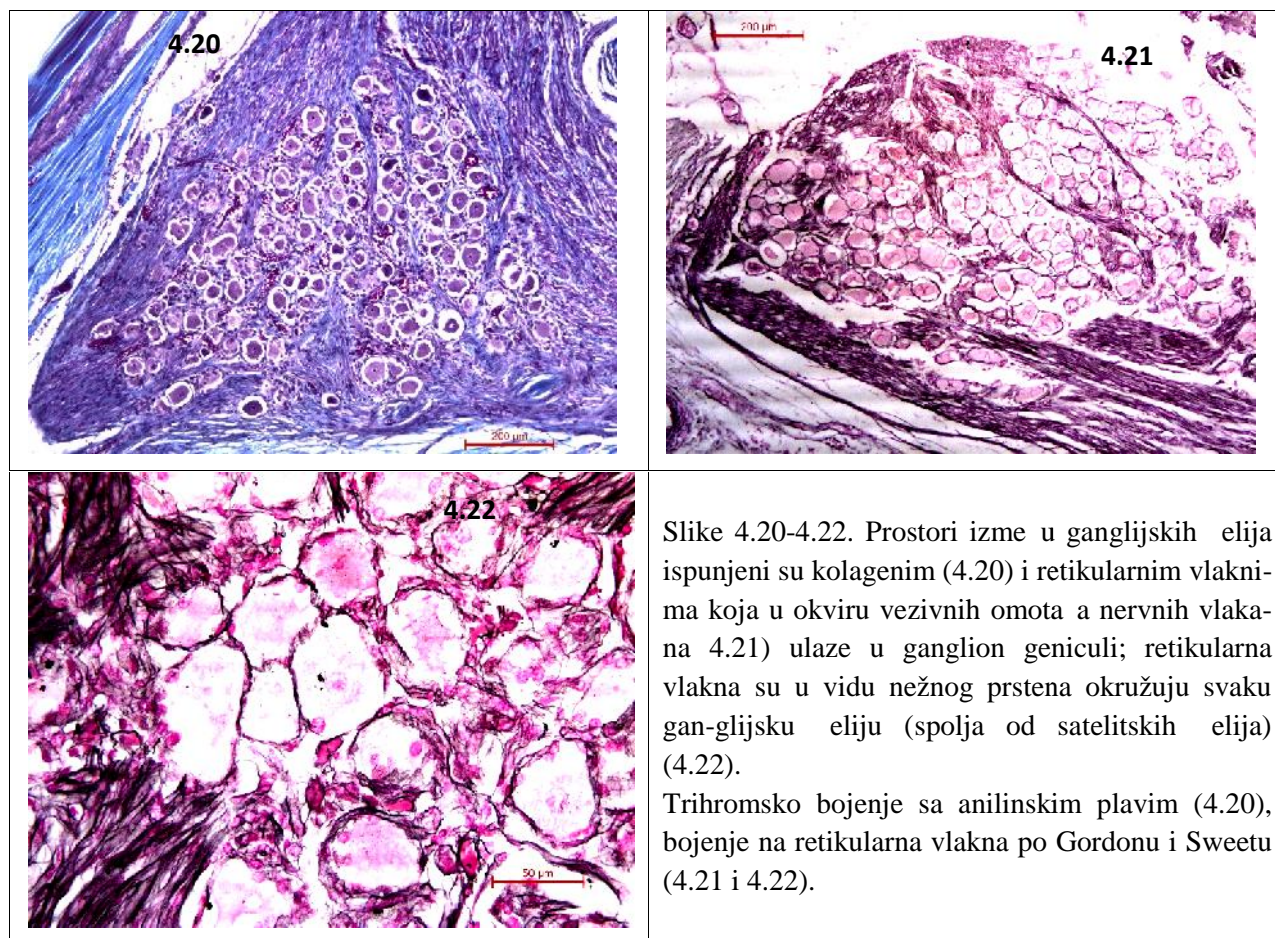


4-18



4-19

Slike 4.18 i 4.19. Gustina kapilarne mreže (4.18) i nervnih vlakana (4.19) u prostoru između ganglijskih elija *ganglionna geniculi*. IHH na CD34 (4.18) i bojenje po Bielschowskom na neurofibrile (4.19).



Slike 4.20-4.22. Prostori izme u ganglijskih elija ispunjeni su kolagenim (4.20) i retikularnim vlaknima koja u okviru vezivnih omota a nervnih vlakna (4.21) ulaze u ganglion geniculi; retikularna vlakna su u vidu nežnog prstena okružuju svaku ganglijsku eliju (spolja od satelitskih elija) (4.22).  
Trihromsko bojenje sa anilinskim plavim (4.20), bojenje na retikularna vlakna po Gordonu i Sweetu (4.21 i 4.22).

Tabela 4.5. Veli ina intercelularnog prostora u ganglionu geniculi

	Intercelularni prostor na popre nom preseku – bod sistem (% površine)		
	1 (do 20%)	2 (od 21%-30%)	3 (od 31-50%)
<b>Ganglion geniculi: broj (%)</b>	<b>2 (10%)</b>	<b>2 (10%)</b>	<b>16 (80%)</b>

Genikulatni ganglion ine ganglijske elije i njihova “kapsula”, koju izgra uju satelitske elije. Koli inska zastupljenost *intercelularnog prostora* u okviru *ganglionu geniculi* prikazana je u tabeli 4.5. Iz rezultata prikazanih u tabeli se vidi da u najve em broju ispitivanih ganglionu (16/20, 80%) intercelularni prostori zauzimaju ak 31-50% površinskog preseka ganglionu (slike 4.14 i 4.15), a u daleko manjem broju slu ajeva taj prostor je manji i zauzima površinu do 30%



preseka gangliona, (6/20; 20%). Logično je da se ovi poslednji ganglioni veoma celularni i da se odlikuju gusto zbijenim ganglijskim elijama (slike 4.16 i 4.17)

Prostor između u ganglijskih elija ispunjen je gustom mikrovaskularnom/kapilarnom mrežom (slika 4.18) i snopovima nervnih vlakana (slika 4.19) i njihovih vezivnih omotača, u kojima dominiraju kolagena i retikularna vlakna (slike 4.20 i 4.21), dok elastičnih vlakana nema. Retikularna vlakna pored toga što su sastavni deo endo- i perineurijuma, u vidu nežnog prstena okružuju svaku ganglijsku eliju (slika 4.22).

### 4.3.3. Citološke karakteristike ganglijskih elija

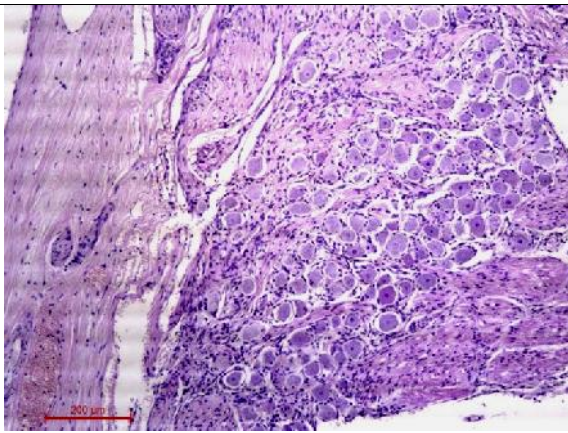
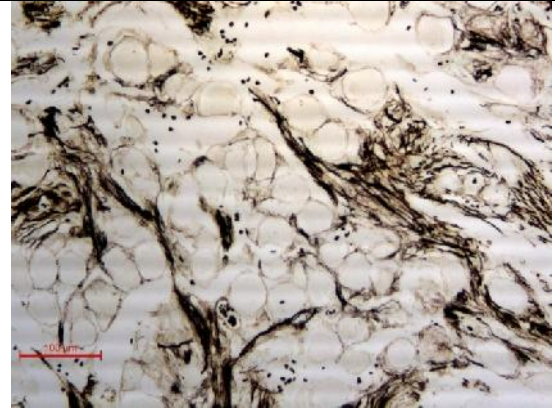
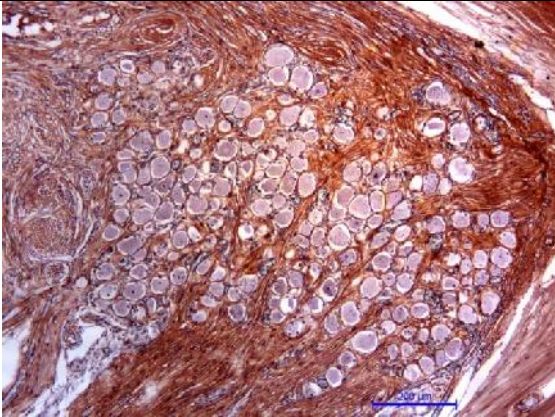
Najveći broj gangliona ima umerenu celularnost, izraženu semikvantitativnom procenom kroz površinu od 50-70% ukupne površine preseka *ganglion geniculi*. Ganglioni sa najvećom elijskom gustinom, u kojima ganglijske elije zauzimaju preko 80% njihove površine su retki i čine samo 10% svih ispitivanih gangliona (3/20); isti procenat se odnosi i na celularne ganglione u kojima ganglijske elije zauzimaju 70-80% površine preseka gangliona (3/20; 10%).

U skladu sa velikom razlikom u celularnosti, procenjenoj semikvantitativno, precizno brojanje svih ganglijskih elija na površini najvećeg preseka svakog od 20 ispitivanih gangliona pokazalo je da se taj broj kretao od 87 do 244 (prosečno  $160,86 \pm 38,18$ ). Prosečna vrednost broja elija izražena na  $\text{mm}^2$  površine preseka *ganglion geniculi* iznosila  $244,4 \pm 57,85$  (od 128 do 343).

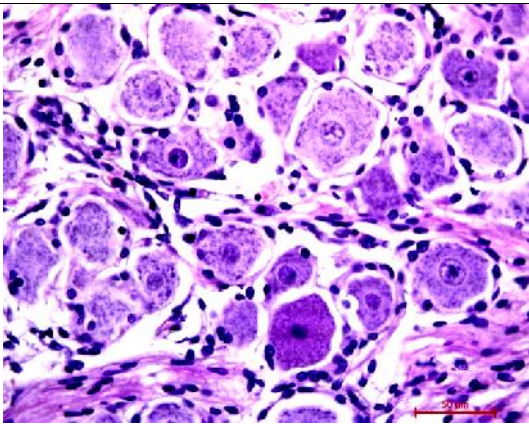
Ganglijske elije u okviru gangliona geniculi upakovane su u vidu elijskih klastera u lamelarnom aranžmanu. Taj aranžman lako se uočava na različitim histohemijskim bojenjima preparata *ganglion geniculi* (slike 4.23-4.25). Lamelarni klasteri od 3-5 do nekoliko desetina elija. Na preparatima su se među elijskim klasterima lako uočavale tamne i svetle elije (slike 4.26 i 4.27), različite veličine, sa nasumičnim rasporedom u okviru klastera.

Tabela 4.5. Semikvantitativna procena celularnosti *ganglion geniculi*.

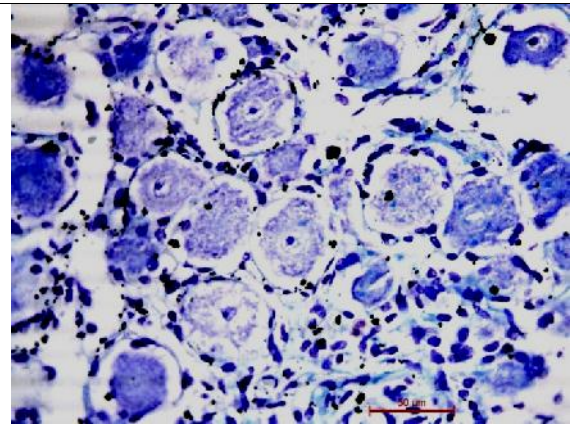
	Ganglijske elije na poprečnom preseku – bod sistem (% površine)		
	1 (50-70%)	2 (71-80%)	3 (preko 80%)
<b>Ganglion geniculi: broj (%)</b>	<b>16/20 (80%)</b>	<b>3/20 (10%)</b>	<b>3/20 (10%)</b>



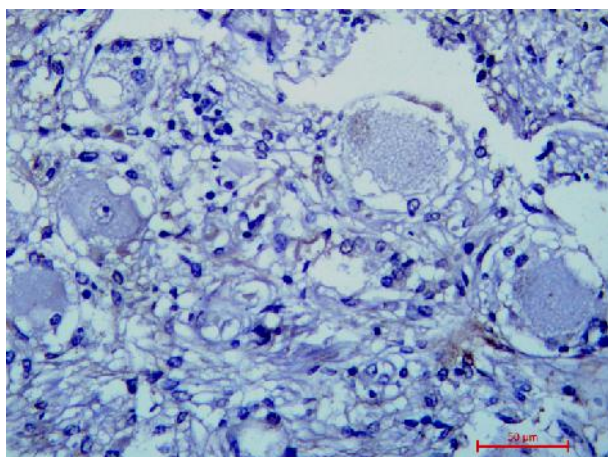
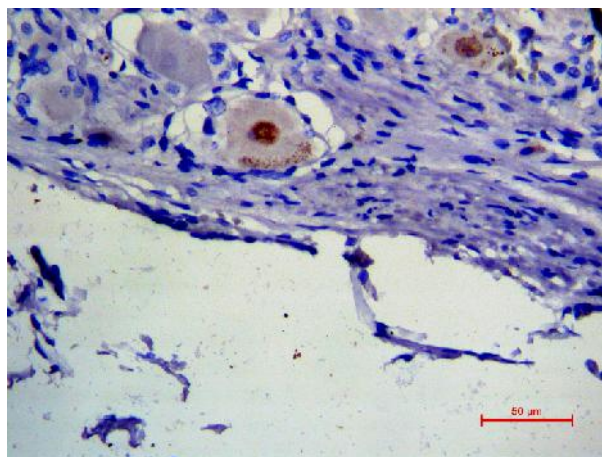
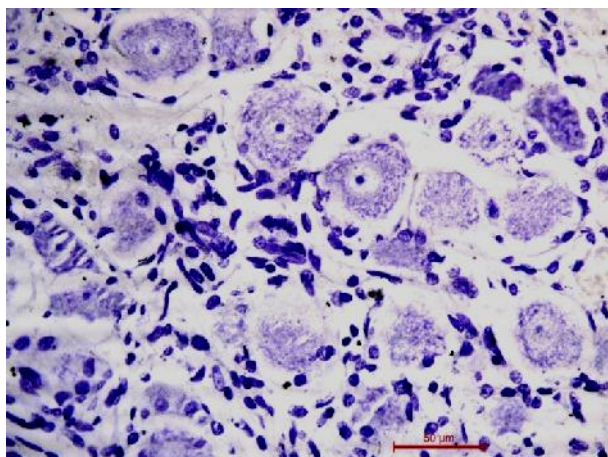
Slike 4.23-4.25. Na svim slikama uoava se lamelarni aranžman ganglijskih elija u *ganglionu geniculi*. U lamelama se nalaze elijski klasteri u kojima se nalazi i do nekoliko desetina elija. Bojenje po Weigert-Van Giesonu za elastna vlakna i vezivo (4.23), bojenje po Bielschowskom za neurofibrile (4.24) i bojenje hematoxilin-eozinom (4.25).



Slika 4.26. Vide se tamne i svetle elije sa jedrima, razli ite veli ine i nepravilnog rasporeda. Bojenje sa H&E.



Slika 4.27. Vide se tamne i svetle elije sa jedrima, razli ite veli ine i nepravilnog rasporeda. Bojenje po Kluver-Barrera.



Slike 4.28-4.30. U ganglijskim elijama, na preparatima obojenim metodom Kluver-Barrera, jasno se uo avava Nisslova tigroidna supstanca (4.28). Na slici 4.29 vide se dve ganglijske elije sa nukleusima pozitivnim na NeuN i citoplazmom u kojoj se uo avaju lipofuscinske granule (IHH na NeuN). Na slici 4.30 vide se vakuolizovane ganglijske elije, a u eliji prese enoj u nivou jedra i vakuolizovano jedro (Mayerov hematoksilin).

Važna citološka odlika ganglijskih elija *ganglionia geniculi* je izražena Nisslova supstanca (slika 4.28), kao i injenica da ove elije izuzetno retko u svojoj citoplazmi pohranjuju lipofuscin – u dva slu aja od 20 ispitivanih ganglionia (10%) (slika 4.29). Vakuolizacija citoplazme i jedara ganglijskih elija uo ena je u tre ini ispitivanih ganglionia (6/20, 30%) (slika 4.30).

Što se ti e morfoloških osobina ganglijskih elija i njihovih mernih osobina, one su prikazane u tabelama 4.7 do 4.9.

Ganglijske elije su pretežno elipsoidnog oblika. Prose ni dijemetar je  $34,21 \pm 0,69 \mu\text{m}$  ( $X \pm SE$ ), sa rasponom vrednosti od 17,740 do 49,113  $\mu\text{m}$ . Prose ni duži dijemetar ganglijske elije je  $37,02 \pm 0,79 \mu\text{m}$  (od 19,842 do 57,374  $\mu\text{m}$ ), a kra i  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$  (od 15,637 do 48,884  $\mu\text{m}$ ). Prose na površina ganglijskih elija je  $944,84 \pm 36,93 \mu\text{m}^2$  (od 243,696 do 1894,372  $\mu\text{m}^2$ ) (tabela 4.7).

Tabela 4.6. Prikaz broja ganglijskih elija kod svih 20 ispitivanih *ganglionna geniculi*.

Genikulatni ganglioni (najveći presek)	Površina ganglionna ( $\mu\text{m}^2$ )	Broj elija na preseku	Broj elija na $\text{mm}^2$ površine ganglionna
1.	635624,094	145	228
2.	633547,646	202	319
3.	531880,324	146	247
4.	646571,134	221	342
5.	678614,804	114	168
6.	667520,752	130	195
7.	656930,718	168	256
8.	650963,711	153	235
9.	801649,697	195	243
10.	548758,747	148	270
11.	777921,504	181	233
12.	681470,596	87	128
13.	505256,036	116	230
14.	661496,305	150	228
15.	670605,961	137	204
16.	926303,344	174	188
17.	508794,44	161	316
18.	647836,805	199	307
19.	710611,400	244	343
20.	418964,214	146	208
$X \pm \text{SD (SE)}$	648,066,112 $\pm$ 25182,97	160,85 $\pm$ 38,18 (8,54)	244,4 $\pm$ 57,85 (12,94)

Tabela 4.7. Merne karakteristike tela genikulatnih ganglijskih elija.

Ganglijske elije, tela (N=100)	X ( $\mu\text{m}$ )	SD ( $\mu\text{m}$ )	SE ( $\mu\text{m}$ )	Min ( $\mu\text{m}$ )	Max ( $\mu\text{m}$ )
<b>R2</b>	31,39	6,84	0,68	15,637	48,884
<b>R1</b>	37,02	7,86	0,79	19,842	57,374
<b>RX</b>	34,21	6,91	0,69	17,740	49,113
<b>Obim</b>	108,09	21,85	2,19	56,122	154,293
	X ( $\mu\text{m}^2$ )	SD ( $\mu\text{m}^2$ )	SE ( $\mu\text{m}^2$ )	Min ( $\mu\text{m}^2$ )	Max ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>Površina</b>	944,84	369,28	36,93	243,696	1894,372

Tabela 4.8. Klasifikacija genikulatnih ganglijskih elija u odnosu na prose ni dijametar i broj satelitskih elija koje ih okružuju.

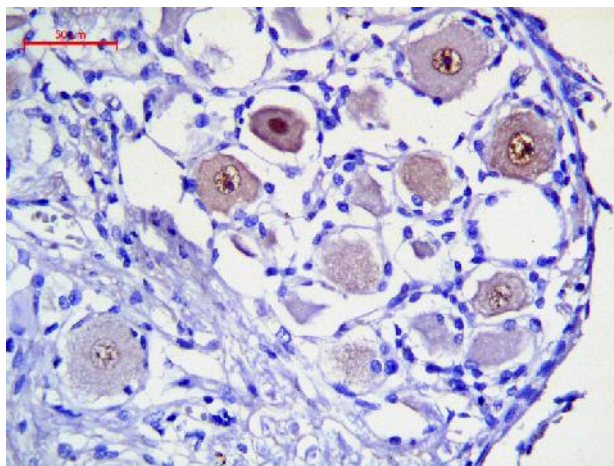
Ganglijske elije (G )			Satelitske elije (S )		
Broj G (%) u odnosu na njihovu veličinu (N= 100)			Broj S na najvećem preseku neurona: min-max (X ± SD)	Broj slojeva elija (%)	
male (15-30 μm)	srednje (31-40 μm)	velike (41-50 μm)		1 (95)	2 (5)
33 (33)	51 (51)	16 (16)	4-11 (6,55 ± 1,58)		

Tabela 4.9. Merne karakteristike jedara genikulatnih ganglijskih elija.

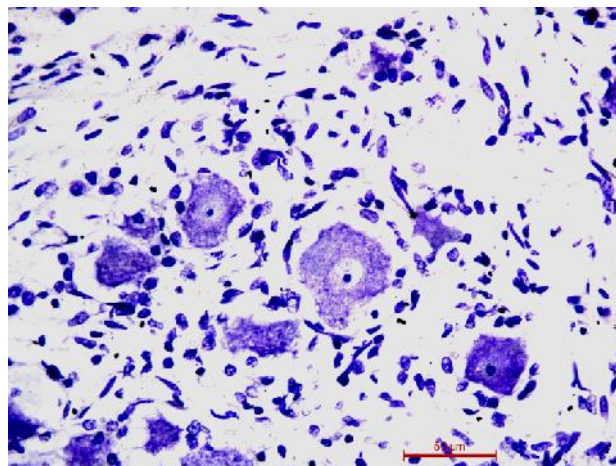
Ganglijske elije, jedra (100)	X μm	SD μm	SE μm	Min μm	Max μm
R2	10,56	1,62	0,16	7,278	14,800
R1	11,59	1,75	0,18	7,921	16,208
RX	11,08	1,65	0,17	7,887	15,504
Obim	34,86	5,19	0,52	24,779	48,756
	X (μm <sup>2</sup> )	SD μm <sup>2</sup>	SE μm <sup>2</sup>	Min (μm <sup>2</sup> )	Max (μm <sup>2</sup> )
Površina	98,21	29,4	2,94	48,857	188,391

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 μm (51/100: 51%), a potom slede male elije sa dijametrom od 15-30 μm (33/100; 33%) i na kraju velike elije dijametra od 41-50 μm (16/100; 16%). Prosečan broj satelitskih elija koje prate ganglijske elije je 6,55±1,58 (od 4-11), i one su u najvećem broju slučajeva raspoređene u jednom koncentričnom sloju (95/100; 95%), a samo u dva sluajeva u ovim istraživanjima ganglijske elije su bile raspoređene u dva koncentrična sloja oko tela neurona (5%) (tabela 4.8).

Jedra ganglijskih elija tako e su bila elipsoidnog oblika, sa prose nim dijametrom od  $11,07 \pm 0,18 \mu\text{m}$  ( $X \pm SE$ ) (raspon od  $7,877 \mu\text{m}$  do  $15,504 \mu\text{m}$ ). Duži dijametar iznosio je  $11,59 \pm 0,18 \mu\text{m}$  ( $7,921$  do  $16,208 \mu\text{m}$ ) a kra i  $10,56 \pm 0,16 \mu\text{m}$  ( $7,278$  do  $14,800 \mu\text{m}$ ). Prose na površina jedara ganglijskih karakteristika iznosila je  $98,21 \pm 2,94 \mu\text{m}^2$  ( $X \pm SE$ ) ( $48,870$  do  $188,391 \mu\text{m}^2$ ). Jedar su bila heterohromatinska i obavezno sadržala jedarca (slike 4.31 i 4.32).



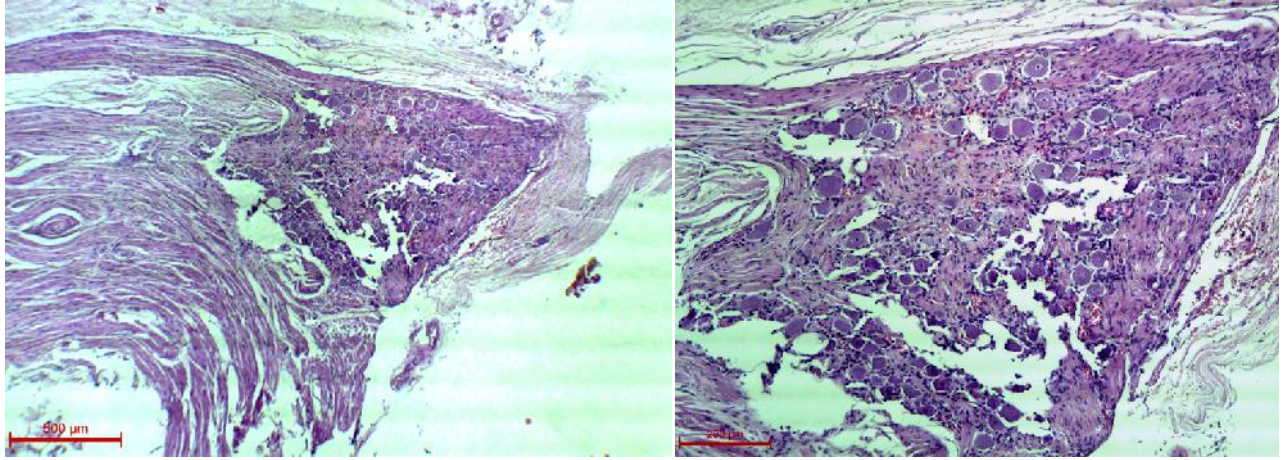
Slika 4.31. Vidi se nekoliko elija sa euhromatskim jedrima i istaknutim jedarcima U vidnom polju samo jedna tamna ganglijska elija ima euhromatsko jedro (IHH, NeuN).



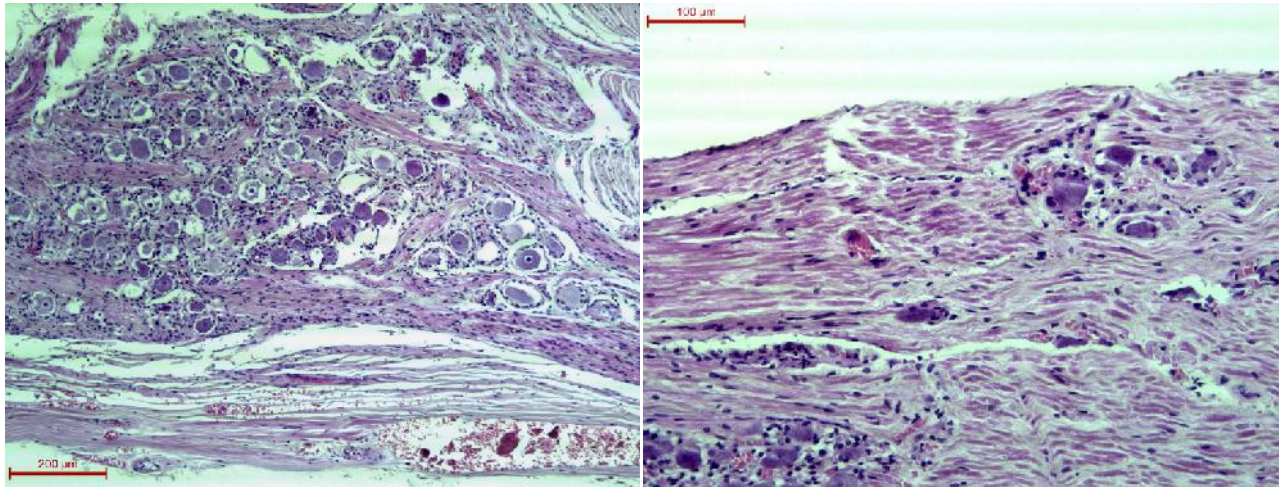
Slika 4.32. Vidi se nekoliko elija sa euhromatskim jedrima i istaknutim jedarcima (bojenja po Kluver-Barrera).

#### 4.3.4. Akcesorne ganglijske elije

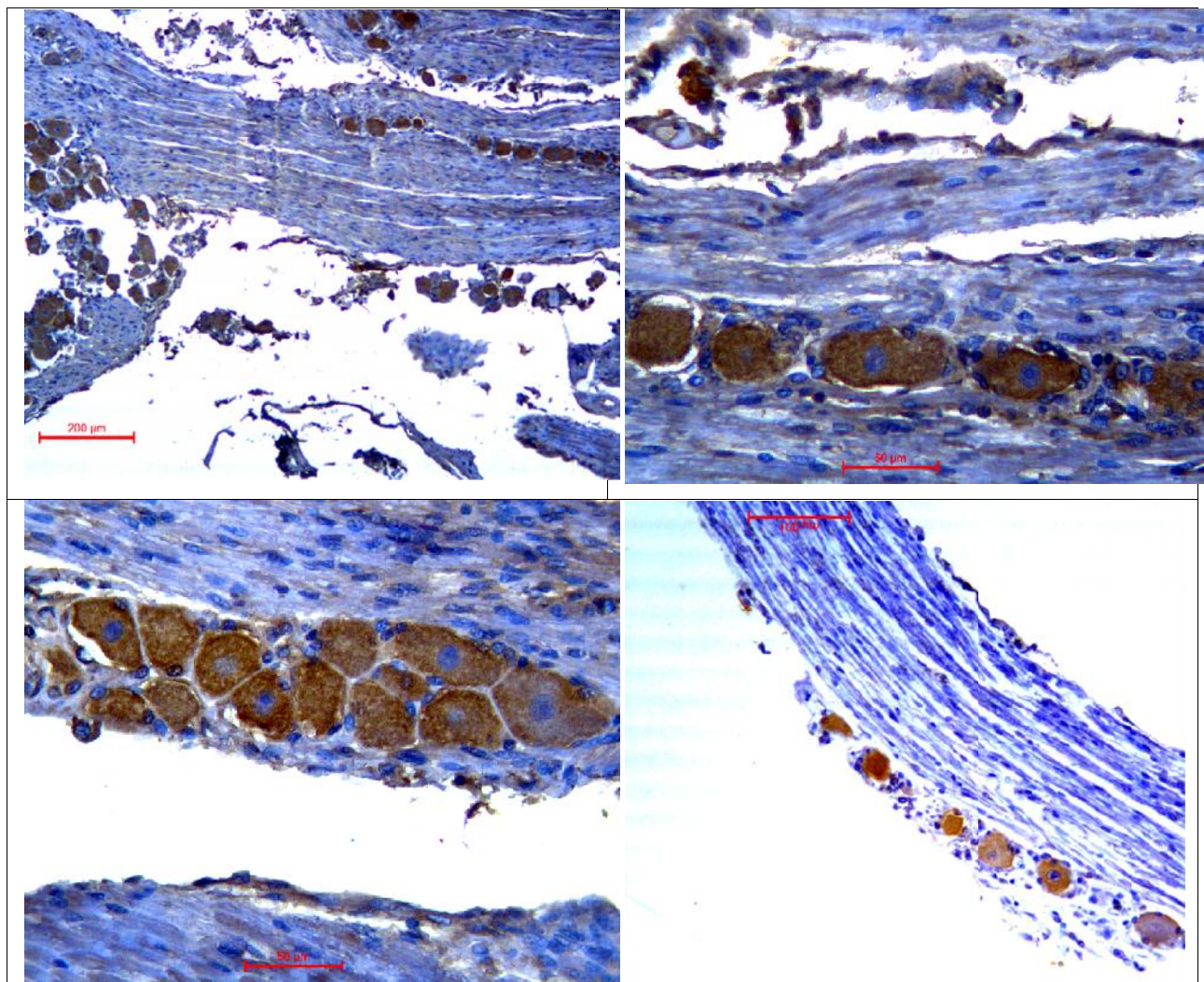
U seriji od 20 ganglionu obuhva enih ovom studijom, samo jedan *ganglion geniculi* bio je sastavljen od gaglijskih elija organizovanih u klasi nom *ganglionu geniculi* lokalizovanom u kolenu facijalnog nerva (slika 4.33a,b), Tako e, jedan ganglion iz ove serije bio je sastavljen od grupica ganglijskih elija razbacanih u labirintnom delu facijalisa. Ostali ganglioni – 18/20 (90%), imali su akcesorne ganglijske elije razbacane u meatusnom delu (u *n. intermedius*) –M deo, i/ili u petroznom delu živca (*n. petrosus major*) –P deo.



Slika 4.33a,b. Uzorak *ganglion geniculi*, na malom (levo) i srednjem uveličanju (desno), koji nije imao akcesorne elije duž *n. intermediusa* i/ili *n. petrosus majora*. (H&E)



Slika 4.34a,b. Uzorak *ganglion geniculi* (levo) sa klasterima akcesornih elija duž *n. intermediusa* (desno). (H&E)

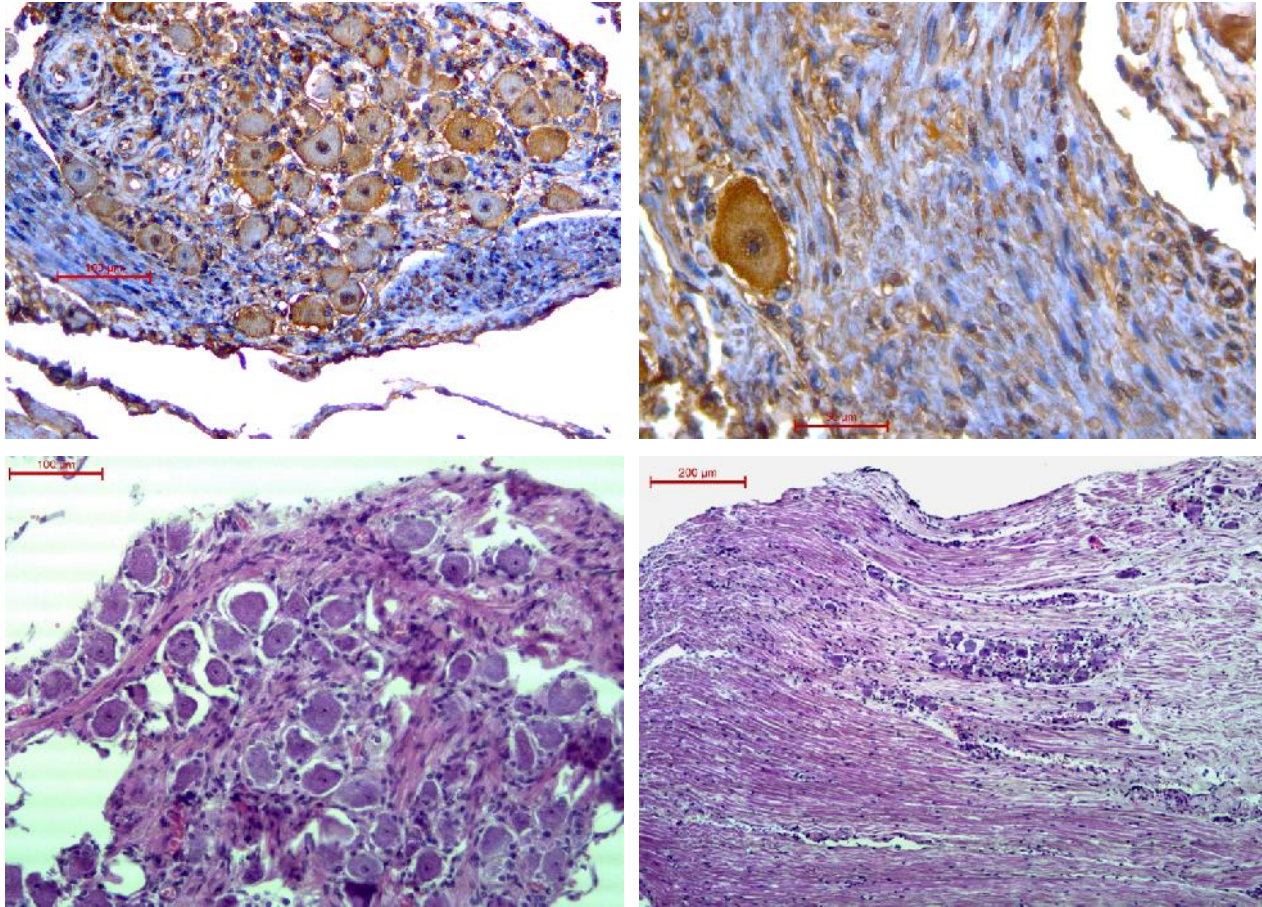


Slika 4.35a,b,c i d. Uzorak *ganglionia geniculi* sa akcesornim elijama u *n. intermediusu* (gore levo i desno, dole levo) i *n. petrosusu majoru* (dole desno) (IHH bojenje na NF-H)

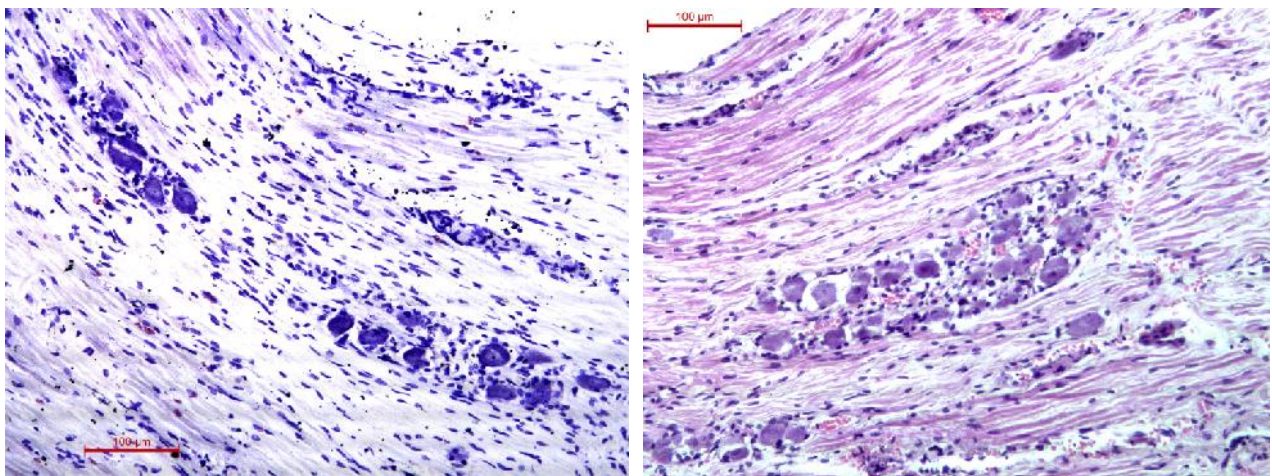
U najvećem broju naših uzoraka, pored postojanja *ganglionia geniculi* u kolenu facijalnog nerva, akcesorne ganglijske elije nalazile su se istovremeno u *n. intermediusu* – u 13/18 (72%) slučajeva (slika 4.34a,b), dok su se preostali slučajevi odnosili na prisustvo akcesornih ganglijskih elija i u *n. intermediusu* i u *n. petrosusu majoru* (5/18, 28%) (slika 4.35a,b,c,d).

Što se tiče broja akcesornih ganglijskih elija on se, u seriji obuhvaćenoj ovom studijom, kretao od 1 do 67 elija po uzorku (slike 4.36a,b i 4.37a,b). Zapaženo je da je broj akcesornih elija, ukoliko se radilo o ganglionima koji su imali akcesorne elije i u *n. intermediusu* i u *n. petrosusu majoru*, bio veći u *n. intermediusu* u odnosu na *n. petrosus major*.



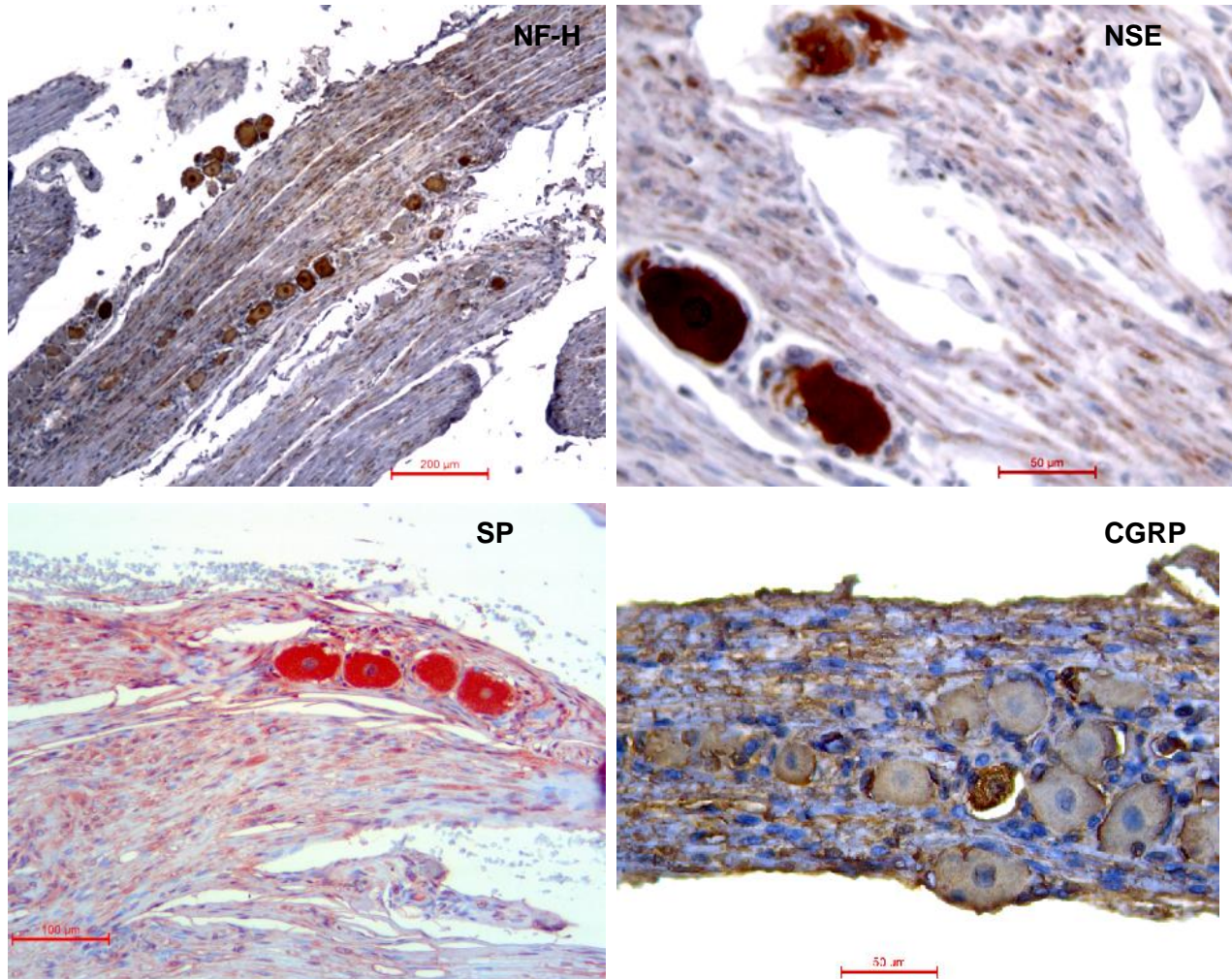


Slike 4.36a,b i 4.37a,b. Na slikama se vide dva različita uzorka *ganglion geniculi* u kojima pored klasi nog ganglion (levo gore i levo dole), postoje i pojedina (desno gore) ili mnogobrojne (desno dole) ganglijske ćelije duž *n. intermediusa*. (IHH bojenje na CGRP, slike gore; H&E, slike dole)



Slike 4.38 i 4.39. Manji (levo) i veći (desno) klasteri ganglijskih ćelija duž *n. intermediusa* dva različita uzorka *ganglion geniculi*. (Kluver-Barrera, levo; H&E, desno).

Kod gangliona koji su imali akcesorne elije u *n. intermedius*, postojao je recipro an odnos broja ganglijskih elija na površini preseka gangliona i onih duž *n. intermediusa* (slike 4.36 i 4.37). elije u *n. intermedius* su bile organizovane u klasterne, a klasteri su brojali od nekoliko do nekoliko desetina elija (slike 4.38 i 4.39). Na osnovu deskriptivne analize, bez primene morfometrije, zapaženo je da su klasterne inile pretežno male ganglijske elije.

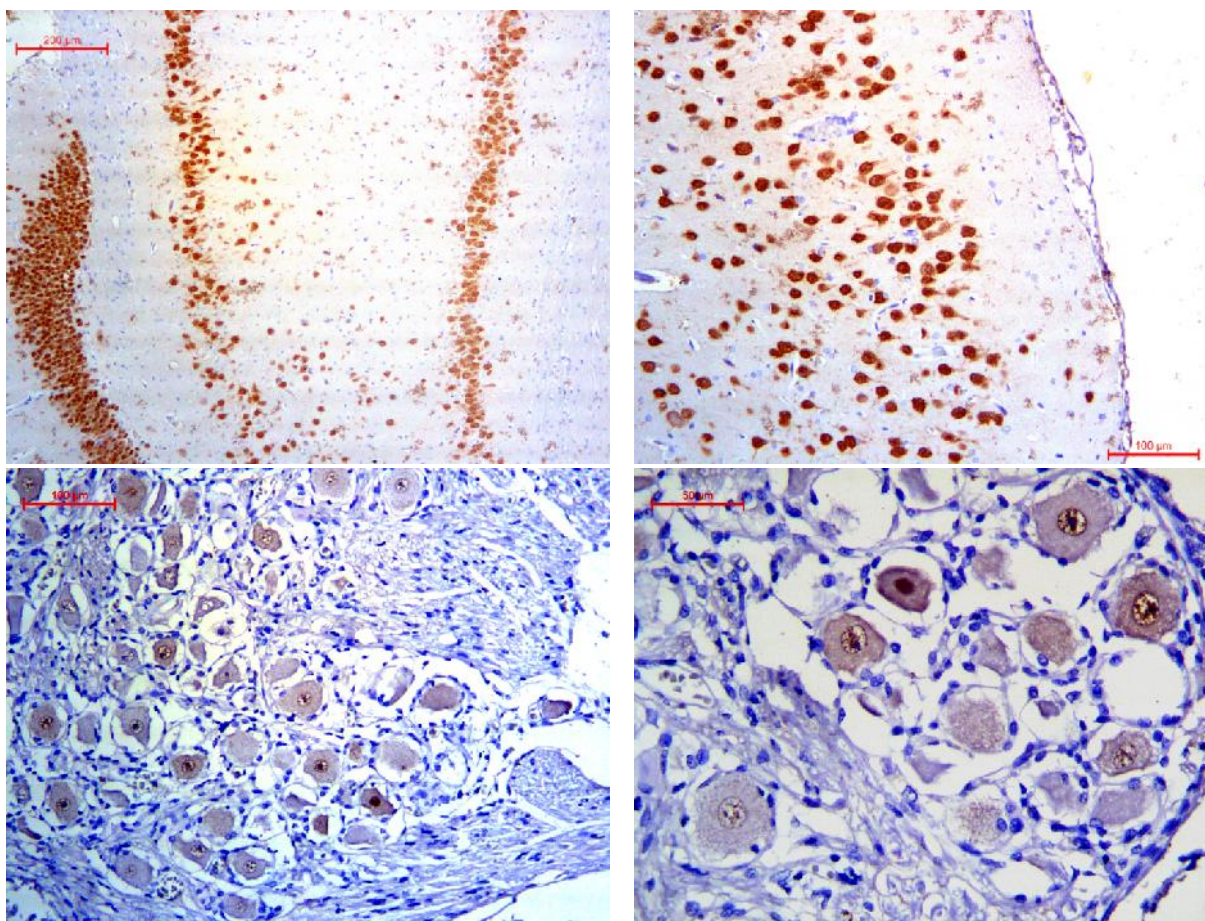


Slike 4.40-4.43. Ekspresija u akcesornim ganglijama NF-H, NSE, SP i CGRP. (IHH)

Što se ti e imunohistohemijske analize akcesornih ganglijskih elija, zapaženo je da su one eksprimirale na sli an na in markere kao i ganglijske elije samog *ganglion geniculi* (slike 4.40 do 4.43), ali zbog malog broja elija smatrali smo da morfometrijska analiza ne bi bila verodostojna. Posebno isti emo da su akcesorne elije eksprimirale NF-H, SP i CGRP.

#### 4.4A. Ekspresija u *ganglionu geniculi* pan-neuronskih markera

Primena pan-neuronskih markera – PGP9.5, NSE, S-100 proteina i Sy (uključujući i NF-H, o kome će biti reči u sledećem odeljku), pokazala je da se ovi markeri ekspimiraju u oko 85-90% ganglijskih ćelija. Intenzitet imunohistohemijske reakcije je pretežno jak i nema bitnih razlika između ekspresije pojedinih od ovih markera (slike 4.14-4.17 iz poglavlja Materijal i metode). Interesantno je da smo u ovoj studiji primenili i bojenje sa NeuN (slike 4.44 i 4.45) i da su ti rezultati pokazali da samo 3/20 ganglionna (15%) pokazuje bojenje na ovaj jedarni protein neurona, pri čemu se u obojenim ganglionima boji samo manja populacija ganglijskih ćelija (od 20 do 50%).



Slike 4.44a,b i 4.45a,b. Ekspresija NeuN u kontrolnom uzorku mozga pacova (gore levo hipokampus i gore desno veliki mozak) i uzorku ganglionna geniculi (srednje uveličanje levo i veliko uveličanje desno). Vidi se jedarna ekspresija ovog proteina. (IHH)

#### 4.4B. Ekspresija u ganglionu geniculi neurofilamentnog proteina velike molekulske težine (NF-H)

Analiza ekspresije NF-H u ganglijskim elijama *ganglionu geniculi* 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  $178 \pm 85,5$  (tabela 4.11).

Tabela 4.10. Distribucija NF-H-IR ganglijskih elija u zavisnosti od intenziteta IHH reakcije\*

	ukupni broj (%)	bez IR broj (%)	IR- elije				Skor IR**
			1+ broj (%)	2+ broj (%)	3+ broj (%)	ukupno broj (%)	
<b>NF-H-IR</b> ganglijske elije	<b>101±27,4</b> <b>(100%)</b>	<b>10±10,2</b> <b>(9%)</b>	29±7,3 (28%)	33±14,9 (33%)	30±21,6 (30%)	<b>92±32,6</b> <b>(91%)</b>	<b>178±85,5</b>

\*Analiza je urađena na uzorku od 12 *ganglionu geniculi*.

\*\*Skor je dobijan tako što su sve elije na svakom od uzoraka semikvantitativnom analizom razvrstavane u četiri ranga – bez-IR (0), slabo IR (1+), umereno-IR (2+) i izrazito-IR (3+) elije, pa je potom broj-IR elija u okviru svakog ranga pomnožen sa datim bodom (0, 1, 2 ili 3); sabiranjem ovako dobijenih proizvoda određen je ukupni skor imunoreaktivnosti za svaki od ispitivanih peptida; sve vrednosti su prikazane kao  $X \pm SD$ .

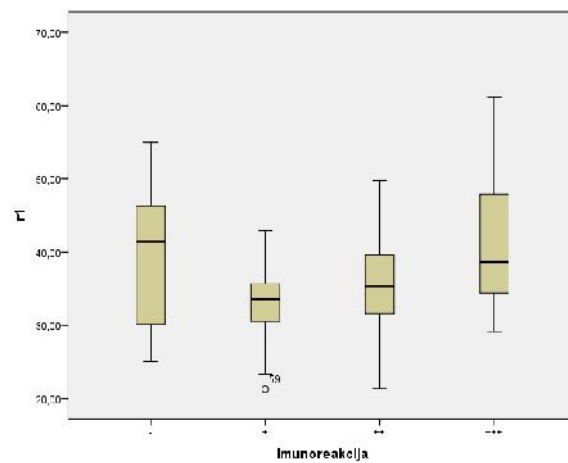
Prikaz vrednosti dužeg, kraćeg i prosejnog dijametra u okviru podgrupa elija bez IR (-), elija sa blagom (+), umerenom (++) i jakom (+++) imunološkom reakcijom dat je na grafikonima 4.1a, b i c. Prikaz vrednosti obima elija i njihove površine unutar svake od četiri navedene podgrupe dat je na grafikonima 4.2 i 4.3. Analizirano je ukupno 89 elija presečenih preko jedra i jedarceta, po svim navedenim parametrima.

Na osnovu analize varijanse (ANOVA) utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika između ove četiri grupe elija po svim analiziranim obeležjima.

Tabela 4.11. Merne karakteristike elija koje ne ekspimiraju NF-H i elija koje ekspimiraju ovaj filament u vidu slabe, umerene ili jake IHH reakcije

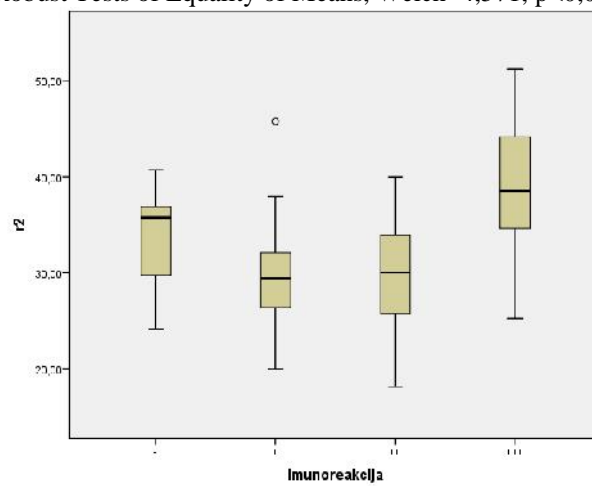
	Imunoreakcija	N	Mean	Std. devijacija	Median	Minimum	Maximum
r1	-	8	39,4623	10,29581	41,3915	25,05	55,01
	+	26	32,8960	5,31026	33,5040	21,26	42,92
	++	35	35,0830	6,81379	35,3130	21,34	49,74
	+++	20	40,8160	8,74910	38,5990	29,16	61,20
	Total	89	36,1261	7,77395	34,8460	21,26	61,20
r2	-	8	33,6859	5,37779	35,7670	24,08	40,69
	+	26	29,5465	5,61111	29,3730	19,97	45,76
	++	35	29,5816	5,25432	30,0380	18,14	39,98
	+++	20	38,3727	6,70358	38,5160	25,22	51,18
	Total	89	31,9158	6,72309	31,2750	18,14	51,18
rx	-	8	36,5740	6,92440	37,3345	25,69	45,15
	+	26	31,2212	4,86811	31,7020	21,63	41,85
	++	35	32,3323	5,38202	31,7890	21,07	41,12
	+++	20	39,5944	6,70664	37,6400	27,63	52,98
	Total	89	34,0209	6,52317	33,0040	21,07	52,98
Površina	-	8	1063,5790	377,23446	1081,9140	516,14	1524,96
	+	26	768,9140	223,49684	782,9290	365,43	1363,83
	++	35	831,0533	264,53378	776,2900	341,93	1313,61
	+++	20	1251,9016	427,93097	1105,7860	595,92	2151,60
	Total	89	928,3741	358,90928	853,3470	341,93	2151,60
Obim	-	8	115,9054	22,24429	118,0885	80,85	145,19
	+	26	98,1330	14,97069	100,1355	68,17	132,06
	++	35	102,2828	17,13794	101,5900	66,65	131,41
	+++	20	125,0273	21,15266	119,6270	87,09	168,44
	Total	89	107,4061	20,64212	103,7510	66,65	168,44

Grafikon 4.1a,b i c. Dijametri NF+ i NF- ganglijskih elija



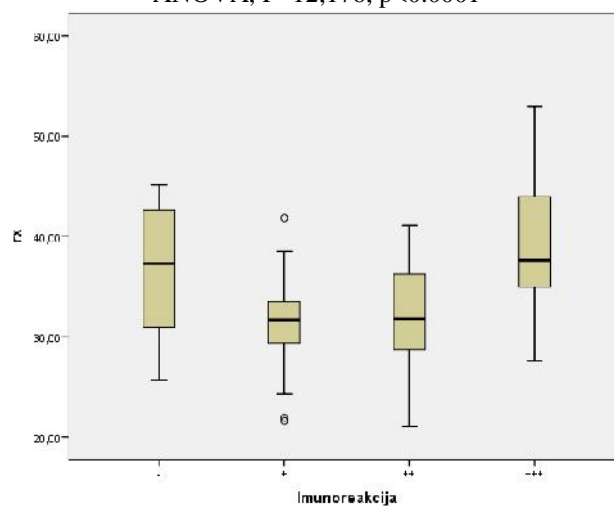
a

Robust Tests of Equality of Means, Welch=4,571,  $p < 0,011$



b

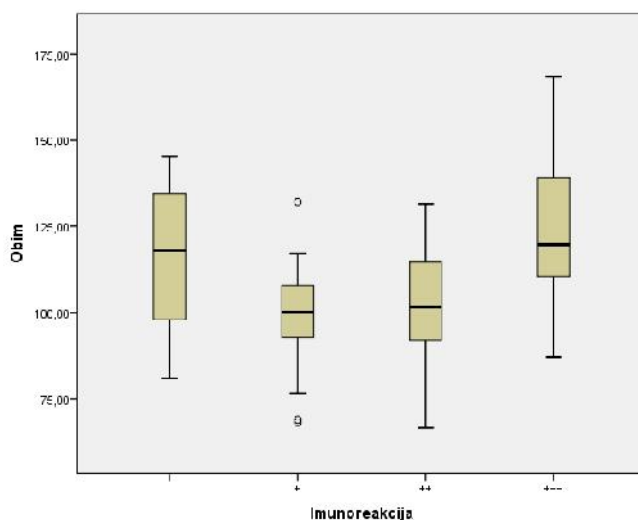
ANOVA,  $F=12,176$ ,  $p < 0,0001$



c

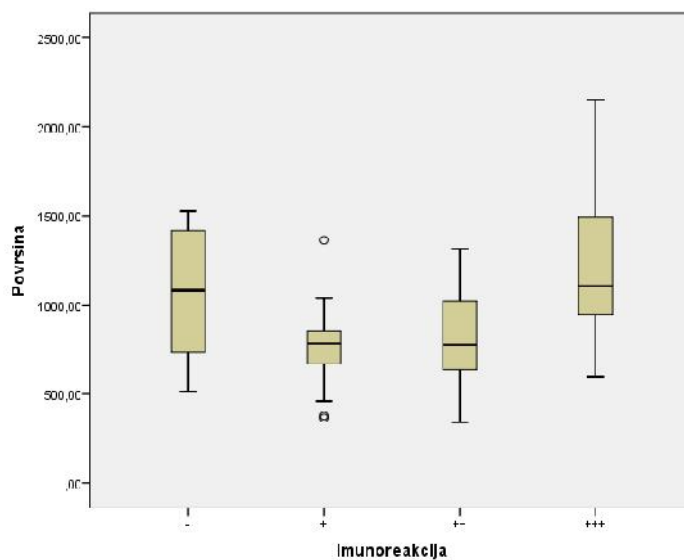
ANOVA,  $F=10,001$ ,  $p < 0,0001$

Grafikon 4.2. Obimi ganglijskih elija koje eksprimiraju i koje ne eksprimiraju NF-H



ANOVA,  $F=10,001$ ,  $p<0,0001$

Grafikon 4.3. Površine ganglijskih elija koje eksprimiraju i koje ne eksprimiraju NF-H



Robust tests of equality of means, Wellsh: 7.538,  $p<0,01$

Analizama naknadnih pore enja primenom *Bonferonijevog* testa i *Dunettovog T3* testa, utvr eno je izme u kojih grupa postoji statisti ki zna ajna razlika (tabele 4.11a i b). elije koje su izrazito eksprimirale NF-H imale su statisti ki zna ajno ve i dijametar, obim i površinu u odnosu na elije koje su umereno eksprimirale NF-H i u odnosu na elije koje su bile slabo IR.

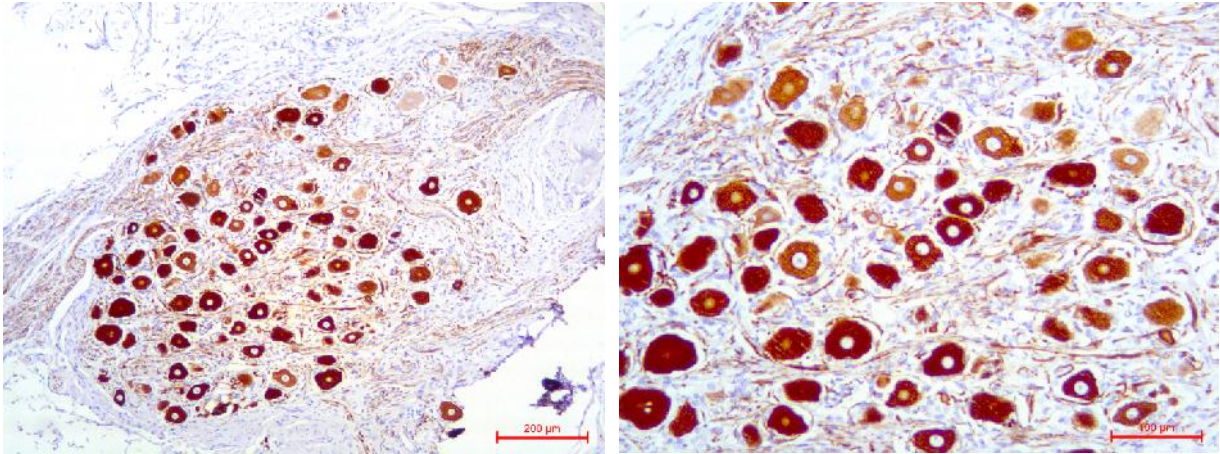
Tabela 4.12a,b. Multiplo pore enje vrednosti r2, rx i obima ganglijskih elija NF-H<sup>+</sup> i NF-H<sup>-</sup> primenom Bonferonijeovog testa i Dunnettovog T3 testa.

Bonferroni					
Dependent Variable	(I) Imunoreakcija	(J) NF-H imunoreakcija			
		-	+	++	+++
		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
r2	-		,462	,424	,321
	+	,462		1,000	<b>,000</b>
	++	,424	1,000		<b>,000</b>
	+++	,321	<b>,000</b>	<b>,000</b>	
Rx	-		,136	,367	1,000
	+	,136		1,000	<b>,000</b>
	++	,367	1,000		<b>,000</b>
	+++	1,000	<b>,000</b>	<b>,000</b>	
Obim	-		,100	,341	1,000
	+	,100		1,000	<b>,000</b>
	++	,341	1,000		<b>,000</b>
	+++	1,000	<b>,000</b>	<b>,000</b>	

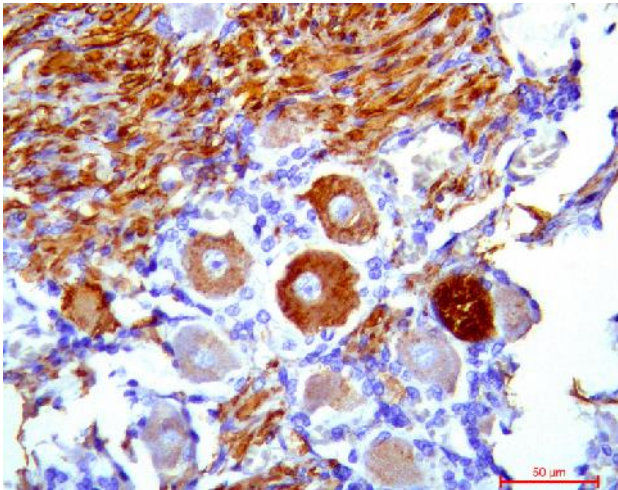
Dunnett T3					
Dependent Variable	(I) Imunoreakcija	(J) Imunoreakcija			
		-	+	++	+++
		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
r1	-		,469	,812	1,000
	+	,469		,648	<b>,007</b>
	++	,812	,648		,093
	+++	1,000	<b>,007</b>	,093	
Površina	-		,293	,512	,816
	+	,293		,899	<b>,001</b>
	++	,512	,899		<b>,003</b>
	+++	,816	<b>,001</b>	<b>,003</b>	

Tipi ni izgled ganglionna obojenog IHH tehnikom na NF-H prikazan je na slikama 4.46a i b i 4.47.





Slike 4.46a i b. Tipičan izgled gangliona geniculi primenom IHH bojenje na NF-H, na malom (a) i srednjem uveličanju (b). Zapažiti približno sličan odnos u broju slaboo, umereno i izrazito obojenih elija.



Slika 4.47. Izgled ganglijskih elija obojenih na NF-H. Vide se ne obojene i obojene elije (različito intenziteta bojenja).

## 4.5. Ekspresija glavnih nociceptivnih peptida - SP i CGRP

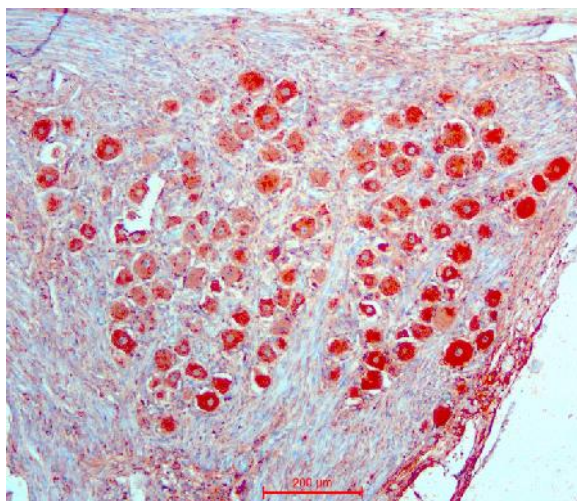
### 4.5.1. Supstanca P

Broj i zastupljenost SP i CGRP-IR elija u *ganglionu geniculi* prikazana je u tabeli 4.12. Supstanca P bila je ekspimirana čak u 70% elija *gangliona geniculi* prisutnih na poprečnom preseku gangliona, dok 30% elija nije ekspimiralo ovaj neuropeptid (slike 4.48 i 4.49). Što se tiče intenziteta IHH reakcije, najveći broj obojenih elija pokazivao je slabu IR (42%), dok su umerena i izrazita IR bile prisutne u podjednaku broju obojenih elija (14%) (slike 4.50 i 4.51).

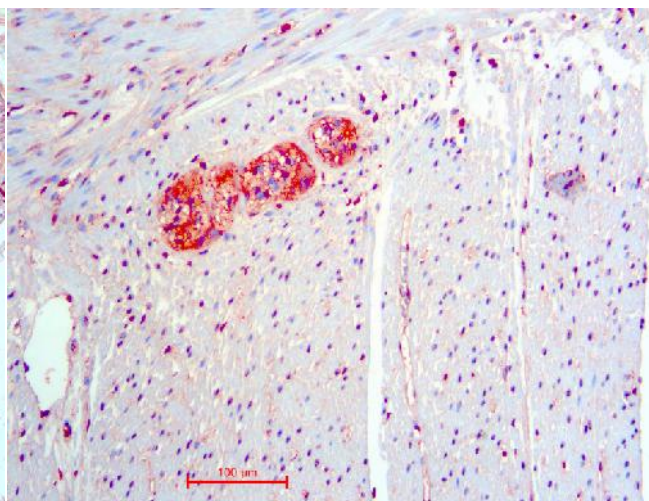
Tabela 4.13. Zastupljenost SP-IR i CGRP-IR elija u *ganglionu geniculi*\*

Neuropeptid- produkuju e elije	ukupni broj (%)	bez IR broj (%)	IR- elije			
			1+ broj (%)	2+ broj (%)	3+ broj (%)	ukupno IR broj (%)
<b>SP-IR</b> elije	81,5±38,3 <b>(100%)</b>	24,75±18,95 <b>(30%)</b>	33,75±17,29 (42%)	11,25±9,47 (14%)	11,75±14,66 (14%)	56,75±24,42 <b>(70%)</b>
<b>CGRP-IR</b> ganglijske elije	81,5±38,3 <b>(100%)</b>	31±31,01 <b>(38%)</b>	26,6±18,41 (34%)	12,88±8,82 (16%)	9,75±6 (12%)	49,25±25,66 <b>(62%)</b>

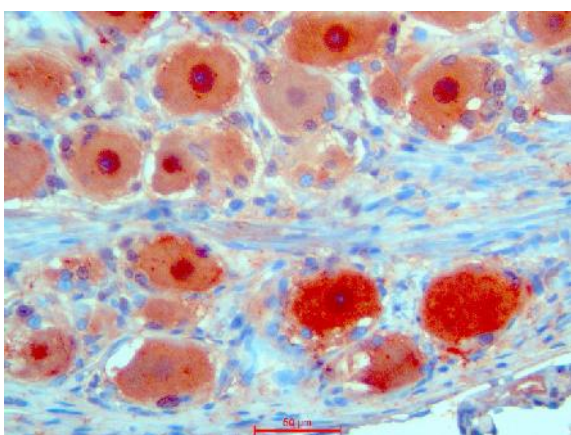
\*Analize su ra ene na uzorku od 8 *ganglionu geniculi*, gde su dva sukcesivna preseka svakog ganglionu bojena IHH na SP i CGRP, a elije su analizirane na celom preseku.



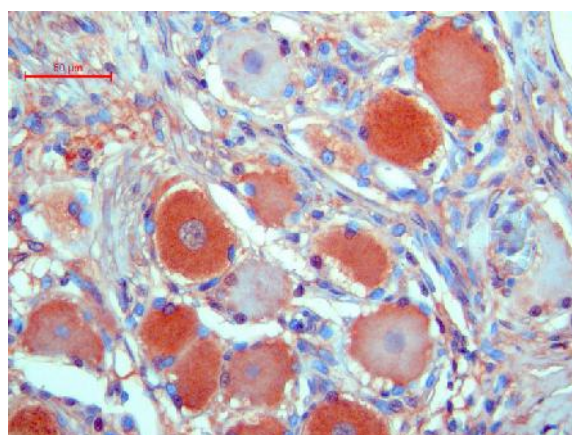
Slika 4.48. Tipičan izgled ganglionu geniculi obojenog na SP (IHH).



Slika 4.49. Kontrolni uzorak tkiva kolona sa mijentirnim ganglijama koje izrazito ekspimiraju SP (IHH).



Slika 4.50. SP-IR ganglijske elije. Zapaziti da su u vidnom polju sve elije IR – slabo, umereno ili izrazito. (IHH)



Slika 4.51. elije gangliona geniculi koje eksprimiraju SP i elije koje ne eksprimiraju. Vide se ne-obojene i obojene elije sa umerenom i slabom IR.

Ukupan proračunati skor IR za supstancu P, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog gangliona, iznosio je  $91,5 \pm 56,41$  (tabela 4.11).

Tabela 4.14. Ukupni skor-imunoreaktivnosti SP i CGRP u ganglijskim elijama *gangliona geniculi*\*

Skor imunoreaktivnosti) ganglijskih elija ( $X \pm SD$ )	
SP	CGRP
$91,5 \pm 56,41$	$81,62 \pm 40,45$

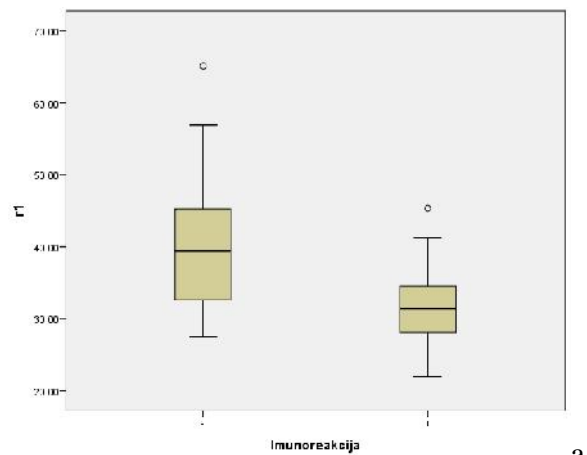
\*Skor je dobijan tako što su sve elije na svakom od uzoraka semikvantitativnom analizom razvrstavane u četiri ranga – bez-IR (0), slabo IR (1+), umereno-IR (2+) i izrazito-IR (3+) elije, pa je potom broj-IR elija u okviru svakog ranga pomnožen sa datim bodom (0, 1, 2 ili 3); sabiranjem ovako dobijenih proizvoda određen je ukupni skor imunoreaktivnosti za svaki od ispitivanih peptida koji je prikazan kao  $X \pm SD$  (za 8 analiziranih uzoraka).

Merne karakteristike elija *gangliona geniculi* koje eksprimiraju i koje ne eksprimiraju SP prikazane su u tabeli 4.13. Statistička analiza je pokazala visoko statistički značajne razlike po svim ispitivanim parametrima (grafikoni 4.4 do 4.6; tabela 4.14).

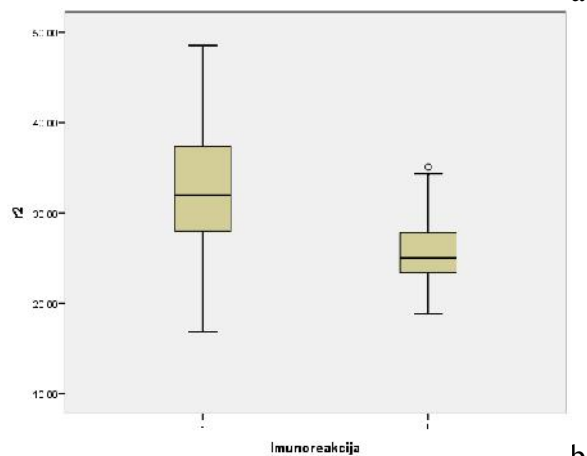
Tabela 4.15. Merne karakteristike elija *gangliona geniculi* koje eksprimiraju i koje ne eksprimiraju SP

	Imunoreakcija	N	Mean	Std. devijacija	Median	Minimum	Maximum
r1	-	50	40,0742	8,69379	39,3955	27,46	65,13
	+	51	31,2095	4,91917	31,3850	21,92	45,35
	Total	101	35,5979	8,30509	34,4030	21,92	65,13
r2	-	50	32,5699	6,61841	31,9750	16,82	48,54
	+	51	25,5768	3,91922	24,9720	18,80	35,06
	Total	101	29,0387	6,44132	27,9420	16,82	48,54
rx	-	50	36,3221	7,07047	35,8000	22,14	53,39
	+	51	28,3931	4,02657	28,6130	21,21	37,88
	Total	101	32,3184	6,96242	30,5850	21,21	53,39
Površina	-	50	1056,1232	400,87585	999,0560	362,84	2129,99
	+	51	636,6721	180,36859	639,8750	350,07	1083,42
	Total	101	844,3212	373,40383	730,4990	350,07	2129,99
Obim	-	50	115,0456	22,62579	113,2095	71,54	171,72
	+	51	89,8075	12,80876	90,2080	66,92	121,30
	Total	101	102,3016	22,21923	96,7790	66,92	171,72

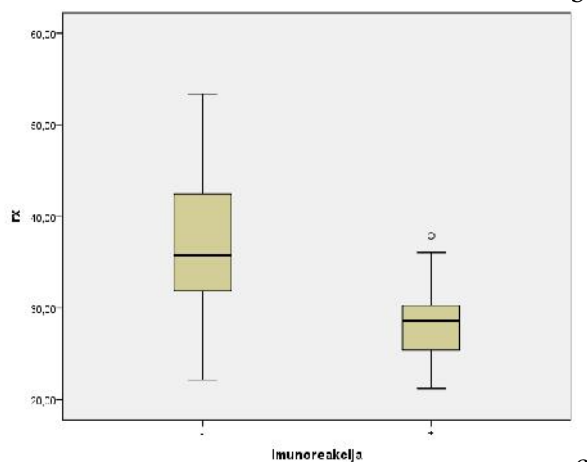
Grafikon 4.4a,b,c. Dijametri SP+ i SP- ganglijskih elija



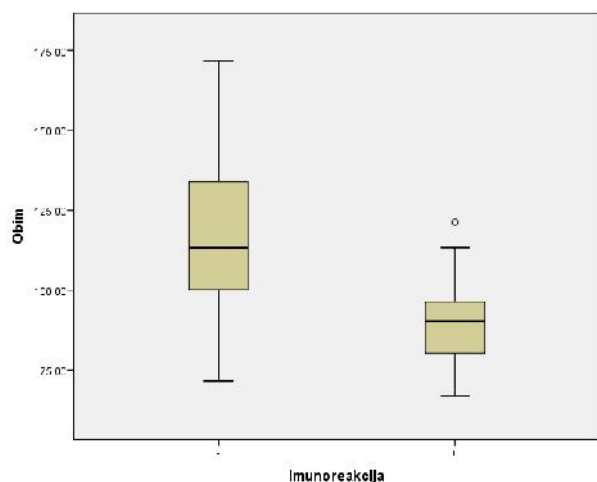
a



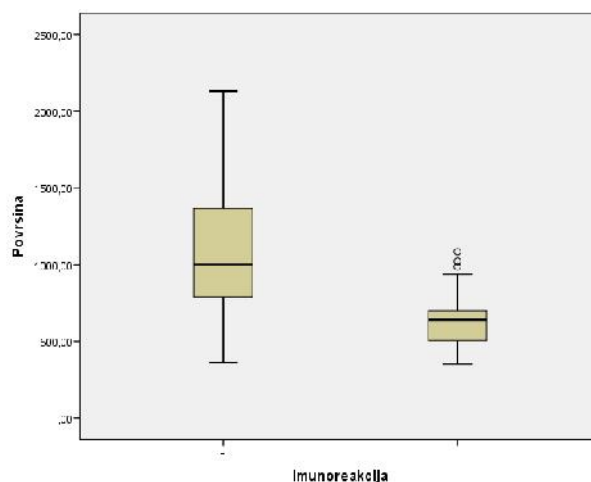
b



c



Grafikon 4.5. Obimi ganglijskih elija koje ekspri-miraju i koje ne ekspri-miraju SP.

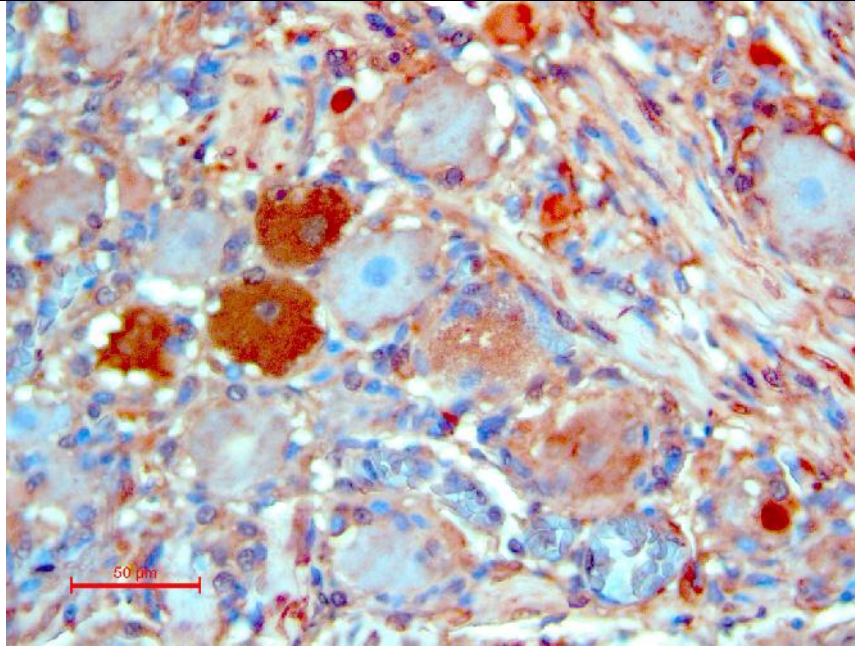


Grafikon 4.6. Površine ganglijskih elija koje eks-primiraju i koje ne ekspri-miraju SP.

t-test for equality of means		
	t	Sig. (2-tailed)
r1	-6,290	<b>,000</b>
r2	-6,445	<b>,000</b>
rx	-6,907	<b>,000</b>
Površina	-6,758	<b>,000</b>
Obim	-6,880	<b>,000</b>

Tabela 4.16. Statisti ka analiza mernih parametara ganglijskih elija koje ekspri-miraju SP i koje ne ekspri-miraju SP, na osnovu Studentovog t-testa.

Ukupno je analizirana 50 elija koja ne ekspri-miraju SP i 51 elija koja ekspri-mira ovaj neuropeptid. Analizirane su samo elije prese ene u nivou jedra i jedarceta. Statisti ka analiza je pokazala da su ganglijske elije koje ekspri-miraju SP, u proseku zna ajno manje po dijametru, obimu i površini u odnosu na ganglijske elije koje ne ekspri-miraju SP (slika 4.52).

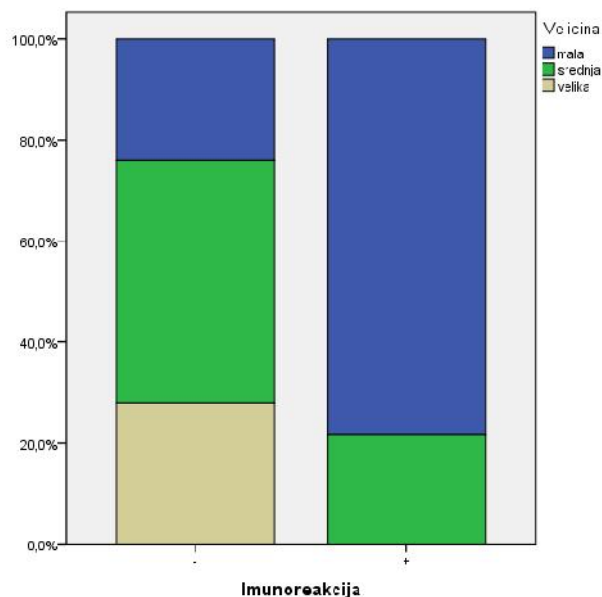


Slika 4.52. Sp+ i SP- elije u ganglionu geniculi. Zapaziti da su elije koje ekspimiraju SP manje po pre niku, obimu i površini od elija koje ne ekspimiraju ovaj neuropeptid. (IHH)

Pore enje malih, srednjih i velikih SP+ i SP- elija, pokazuje da postoje visoke statisti ki zna ajne razlike u distribuciji imunoreaktivnosti (tabele 4.15 i 4.16; grafikon 4.7). Ove analize su bile u skladu sa prethodno prikazanim prose nim vrednostima veli ine, obima i površine ganglijskih elija, i potvrdile su da su SP+ elije pripadale srednjim i malim ganglijskim elijama, dok su SP- elije bile distribuirane u elijama razli itim po veli inama, ali da je u okviru te populacije bilo zna ajno u eš e srednjih elija.

Tabela 4.17. Distribucija SP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija.

		Veli ina elija			Total	
		mala	srednja	velika		
SP- imunoreakcija	-	Count	12	24	14	50
		% within	24,0%	48,0%	28,0%	100,0%
	+	Count	40	11	0	51
		% within	78,4%	21,6%	0,0%	100,0%
ukupno		Count	52	35	14	101
		% within	51,5%	34,7%	13,9%	100,0%



Grafikon 4.7. Grafički prikaz distribucije SP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija.

	Value	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	33,899 <sup>a</sup>	,000
Linear-by-Linear Association	33,181	,000

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,93.

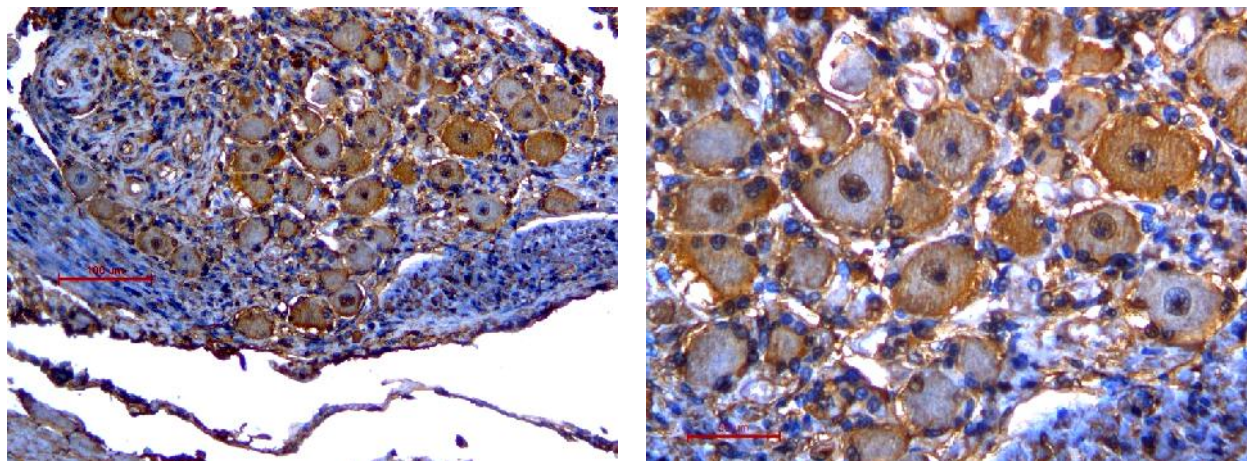
Tabela 4.18. Statistička analiza distribucije SP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija, na osnovu *Chi-Square* testova (*Pearsonovog* i testa linearne asocijacije)

#### 4.5.2. CGRP

Broj i zastupljenost CGRP-IR elija u ganglionu geniculi prikazana je u prethodnoj tabeli 4.12. CGRP se ekspresirao u 62% elija, dok 38% elija nije ekspresiralo ovaj neuropeptid (slika 4.53a i b). Što se tiče intenziteta IHH reakcije, najveći broj obojenih elija pokazivao je slabu IR (34%), umerenu imonearkivnost je ispolilo (16%), a izrazitu najmanji procenat elija (12%).

Merne karakteristike elija *ganglionum geniculorum* koje ekspresiraju i koje ne ekspresiraju SP prikazane su u tabeli 4.17. Analizirana je ukupno 171 elija presečena preko jedra i jedarceta – 71 negativna elija i 100 pozitivnih elija.

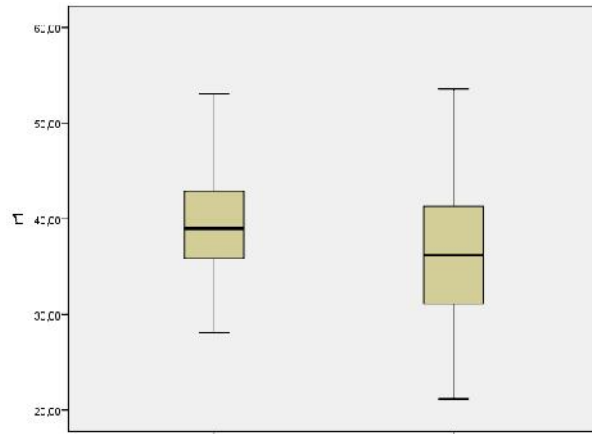




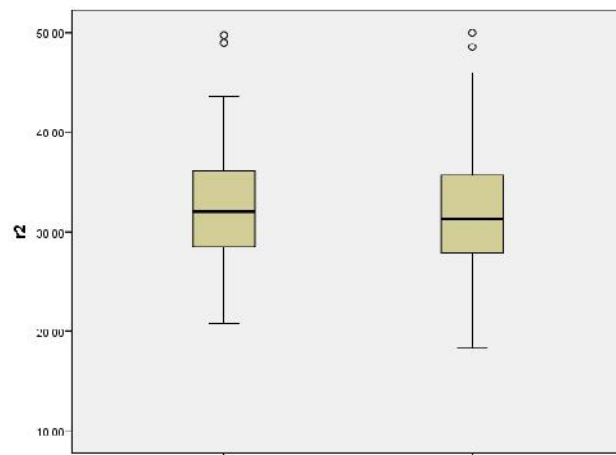
Slika 4.53a i b. Tipičan izgled gangliona geniculi na malom (a, levo) i srednjem (b, desno) uveličanju obojenog na CGRP. Vide se neobojene elije kao i obojene elije sa različitim stepenom ekspresije imunoreaktivnosti. (IHH)

Tabela 4.19. Merne karakteristike elija gangliona geniculi koje ekspimiraju i koje ne ekspimiraju CGRP.

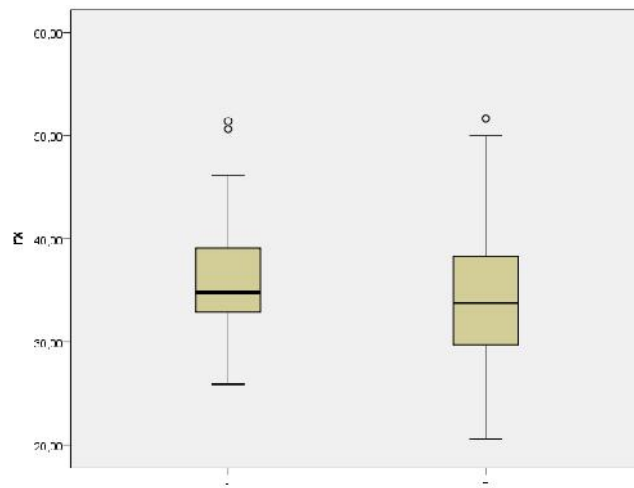
	IR	N	Mean	Std. devijacija	Median	Minimum	Maximum
r1	-	71	39,4152	5,87838	38,9620	28,08	53,06
	+	100	36,4040	7,29882	36,1965	21,17	53,61
	Total	171	37,6543	6,88962	37,5970	21,17	53,61
r2	-	71	32,6445	5,79044	32,0350	20,77	49,75
	+	100	31,5785	6,63345	31,2410	18,30	49,95
	Total	171	32,0211	6,30149	31,2870	18,30	49,95
rx	-	71	36,0299	5,15309	34,7760	25,88	51,41
	+	100	33,9912	6,61786	33,7800	20,58	51,65
	Total	171	34,8377	6,11997	34,0920	20,58	51,65
Površina	-	71	1021,9836	309,51473	945,1810	522,14	2073,23
	+	100	933,1687	362,59137	888,4025	331,28	2092,99
	Total	171	970,0451	343,41923	907,2430	331,28	2092,99
Obim	-	71	113,7713	16,40508	109,6680	81,59	161,58
	+	100	107,2744	20,79910	106,4795	64,76	162,35
	Total	171	109,9719	19,31459	107,2460	64,76	162,35



a

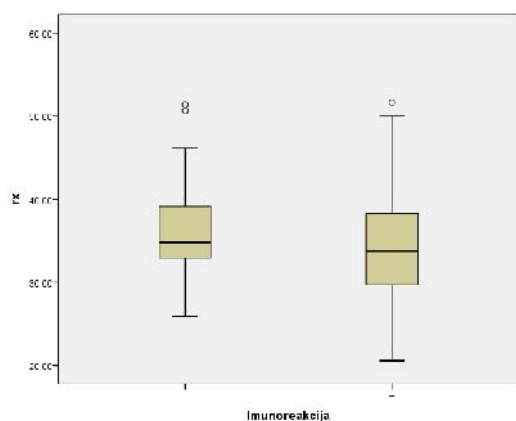


b

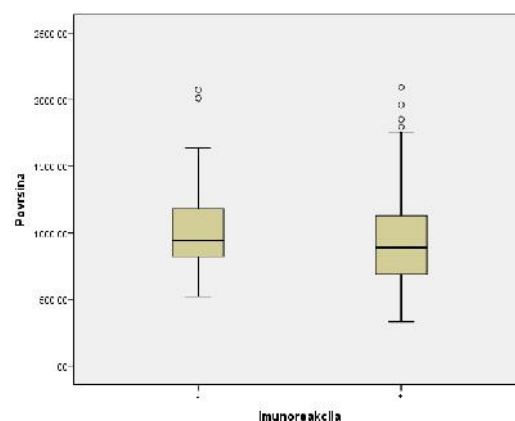


c

Grafikon 4.8a,b,c. Dijametri CGRP+ i CGRP- ganglijskih elija



Grafikon 4.9. Obimi ganglijskih elija koje ekspri-miraju i koje ne ekspri-miraju CGRP.



Grafikon 4.10. Površine ganglijskih elija koje eks-pri-miraju i koje ne ekspri-miraju CGRP.

	t-test for Equality of Means	
	t	Sig. (2-tailed)
r1	-2,982	<b>,003</b>
r2	-1,091	,277
rx	-2,170	<b>,031</b>
Površina	-1,675	,096
Obim	-2,192	<b>,030</b>

Tabela 4.20. Statisti ka analiza mernih parametara ganglijskih elija koje ekspri-miraju CGRP i koje ne ekspri-miraju ovaj neuropeptid, na osnovu Studentovog t-testa.

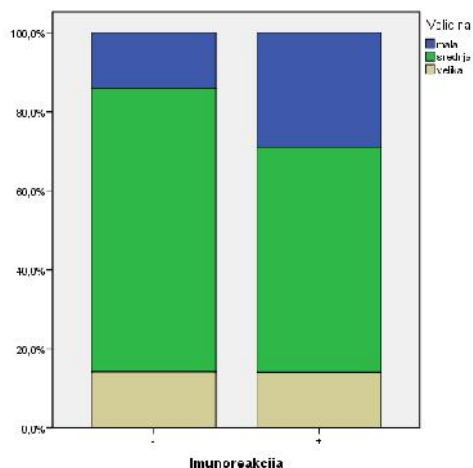
Tabela 4.21. Distribucija CGRP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija

		Veli ina ganglijskih elija			Ukupno	
		mala	srednja	velika		
CGRP- Imunoreakcija	-	broj	10	51	10	71
		u eš e u %	14,1%	71,8%	14,1%	100,0%
	+	broj	29	57	14	100
		u eš e u %	29,0%	57,0%	14,0%	100,0%
Ukupno	broj	39	108	24	171	
	u eš e u %	22,8%	63,2%	14,0%	100,0%	

Tabela 4.22. Statisti ka analiza distribucije CGRP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija, na osnovu *Chi-Square* testova.

	Value	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,496 <sup>a</sup>	,064
Linear-by-Linear Association	2,575	,109

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,96.



Grafikon 4.11. Grafi ki prikaz distribucije CGRP-IR u okviru malih, srednjih i velikih ganglijskih elija.

Statisti ka analiza je pokazala da izme u CGRP+ i CGRP- elija nema razlike u njihovoj površini, ali da su CGRP+ elija imale manji dijаметar (ve i i prose ni) od CGRP- elija.

Pore enje malih, srednjih i velikih CGRP+ i CGRP- elija, pokazuje da nema statisti ki zna ajne razlike u distribuciji CGRP-IR (tabele 4.16 i 4.17). Naime, i CGRP+ i CGRP- elije klasifikovane su u sli nom procentu kao male, srednje i velike, a bilo je generalno najviše srednjevelikih elija u obe podgrupe (grafikon 4.11).

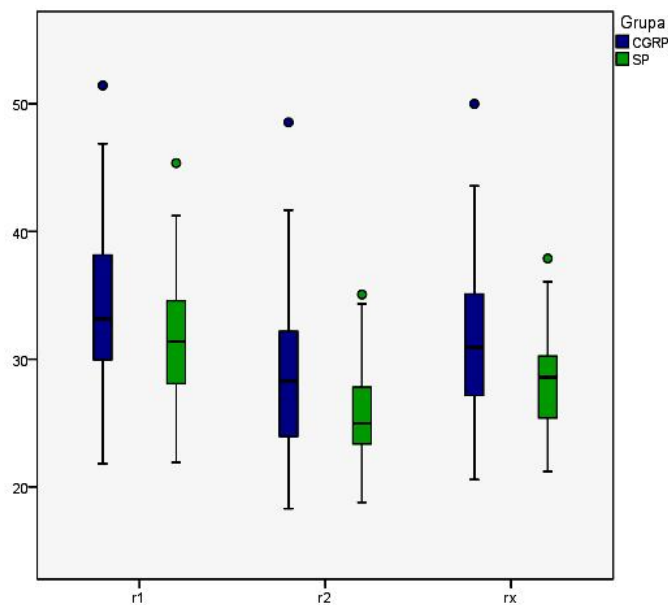
#### 4.5.3. Pore enje SP i CGRP-imunopozitivnih elija

Na tabeli 4.18. i grafikonima 4.12, 4.13, i 4.14, dat je uporedni prikaz mernih parametara SP+ i CGRP+ elija *ganglionae geniculi*. Statisti ka obrada rezultata pokazala je da su CGRP+ elije statisti ki zna ajno ve e od SP+ elija u pogledu dijametra, obima i površine.

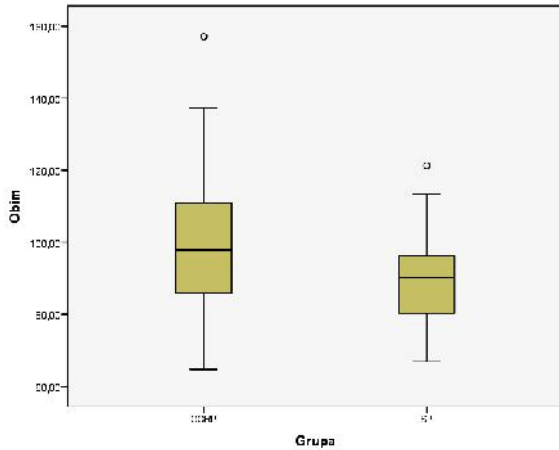
Na sukcesivnim tkivnim presecima *ganglionae geniculi*, obojenim IHH tehnikama na SP i CGRP, esto se mogla zapaziti kolokalizacija oba neuropeptida u istoj ganglijskoj eliji (slike 4.56 i 4.57), ali i ekspresija SP i CGRP u razli itim ganglijskim elijama (slike 4.58 i 4.59).

Tabela 4.23. Uporedni prikaz mernih parametara SP+ i CGRP+ elija ganglionu geniculi

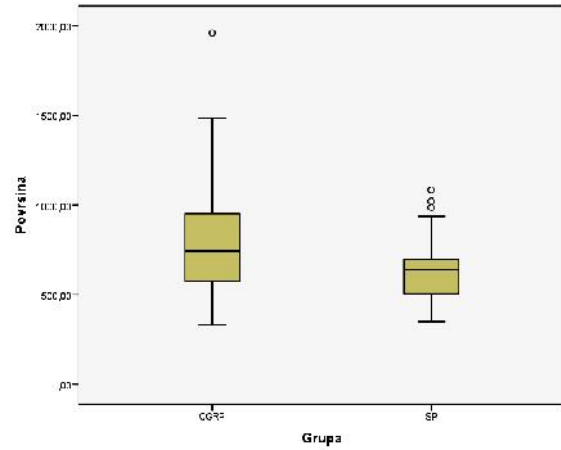
	Grupa	N	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
r1	CGRP	54	33,7518	6,50179	33,1930	21,82	51,43
	SP	51	31,2095	4,91917	31,3850	21,92	45,35
	Total	105	32,5170	5,89974	32,5420	21,82	51,43
r2	CGRP	54	28,8571	6,54640	28,3110	18,30	48,54
	SP	51	25,5768	3,91922	24,9720	18,80	35,06
	Total	105	27,2638	5,65138	26,2610	18,30	48,54
rx	CGRP	54	31,3045	6,36562	30,9120	20,58	49,99
	SP	51	28,3931	4,02657	28,6130	21,21	37,88
	Total	105	29,8904	5,53016	29,3030	20,58	49,99
Površina	CGRP	54	794,6244	330,65293	742,5920	331,28	1960,79
	SP	51	636,6721	180,36859	639,8750	350,07	1083,42
	Total	105	717,9047	278,65711	664,0600	331,28	1960,79
Obim	CGRP	54	98,7602	19,92773	97,8505	64,76	157,10
	SP	51	89,8075	12,80876	90,2080	66,92	121,30
	Total	105	94,4117	17,36279	92,6030	64,76	157,10



Grafikon 4.12. Poređenje SP+ i CGRP+ elija genikulatnog ganglionu u odnosu na pre niku elija.



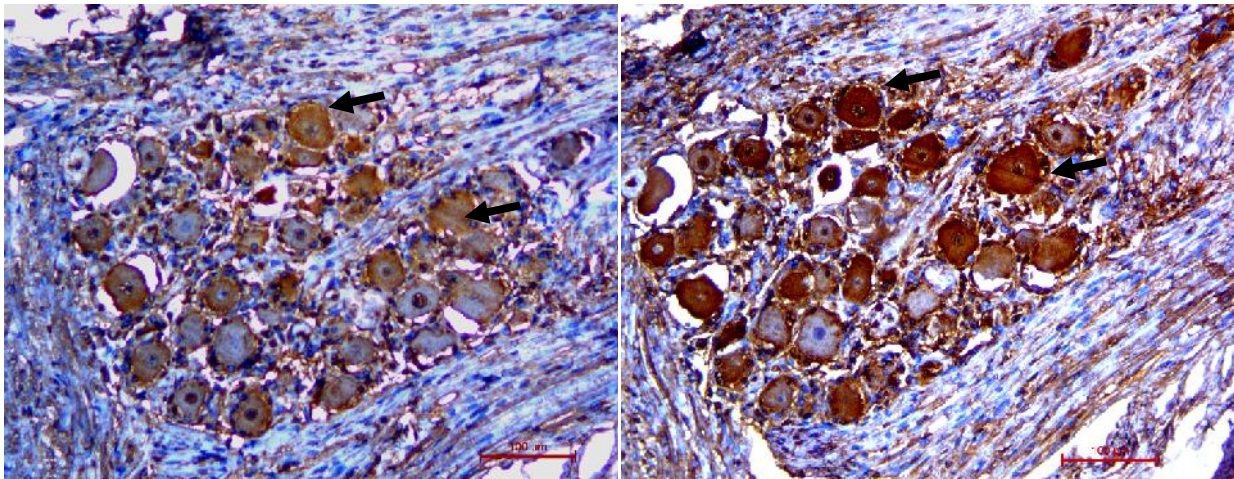
Grafikon 4.13. Poređenje obima SP+ i CGRP+ elija u ganglionu geniculi.



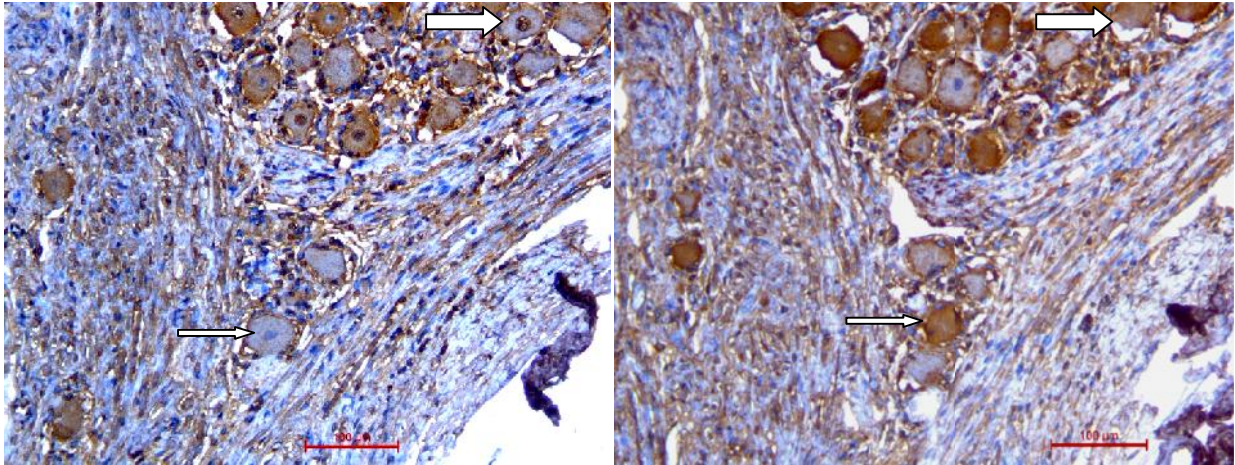
Grafikon 4.14. Poređenje površina SP+ i CGRP+ elija u ganglionu geniculi.

	t-test	
	t	p vrednost
r1	2,250	<b>,027</b>
r2	3,135	<b>,002</b>
rx	2,817	<b>,006</b>
Površina	3,061	<b>,003</b>
Obim	2,754	<b>,007</b>

Tabela 4.24. Testiranje značajnosti razlike merenih parametara SP+ i CGRP+ ganglijskih elija, na osnovu Studentovog t-testa. izme u



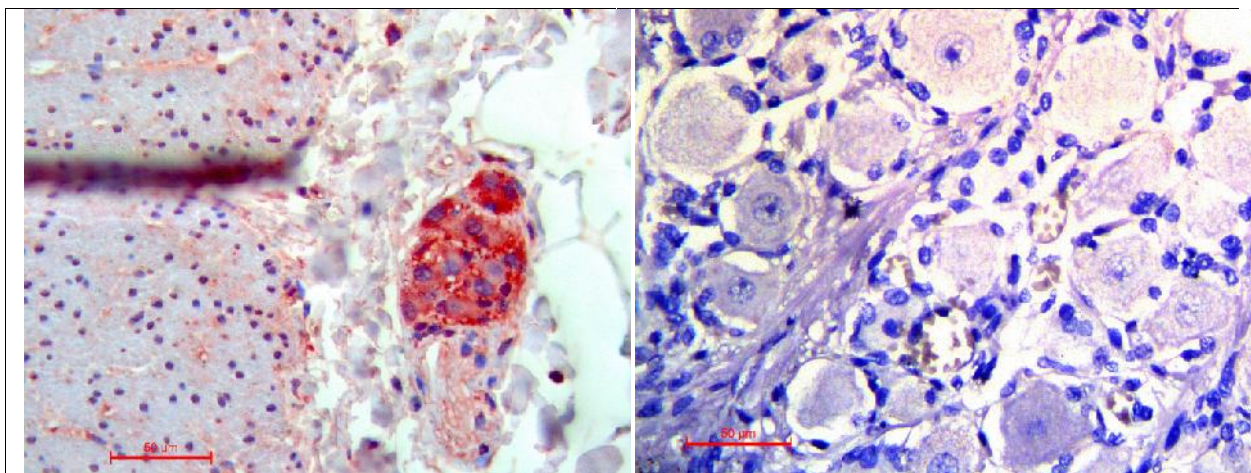
Slike 4.56 i 4.57. Na slici sa leve strane prikazan je preparat gangliona geniculi obojen IHH na SP, a na slici desno isti preparat obojen na sukcesivnom preseku na CGRP. Strelice pokazuju neke od elija u kojima ova dva peptida kolokaliziraju. (IHH)



Slike 4.58. i 4.59. Na slici sa leve strane prikazan je preparat *ganglion geniculi* obojen IHH na SP, a na slici desno isti preparat obojen na sukcesivnom preseku na CGRP. Strelice pokazuju neke od elija u kojima ova dva peptida ne kolokaliziraju. (IHH)

#### 4.6. Ekspresija drugih neuropeptida – VIP-a, NPY i somatostatina

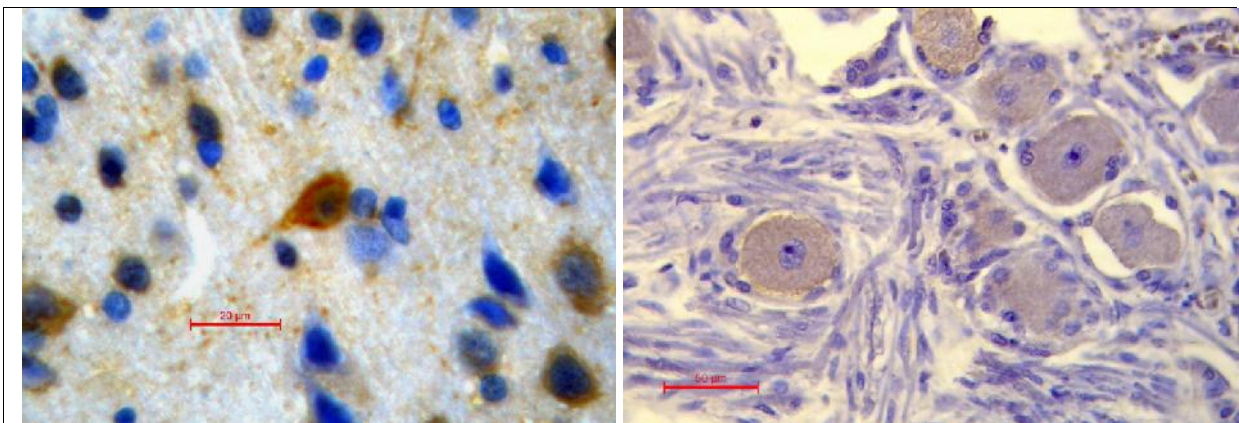
Primenom imunohistohemijskih metoda bojenja nije pokazana ekspresija VIP-a, NPY niti somatostatina u ganglijskim elijama *ganglion geniculi*, dok su kontrolni uzorci pokazivali VIP-IR (slike 4.60 i 4.61).



Slika 4.60. VIP+ ganglije submukoznog pleksusa u kolonu oveka. (IHH)

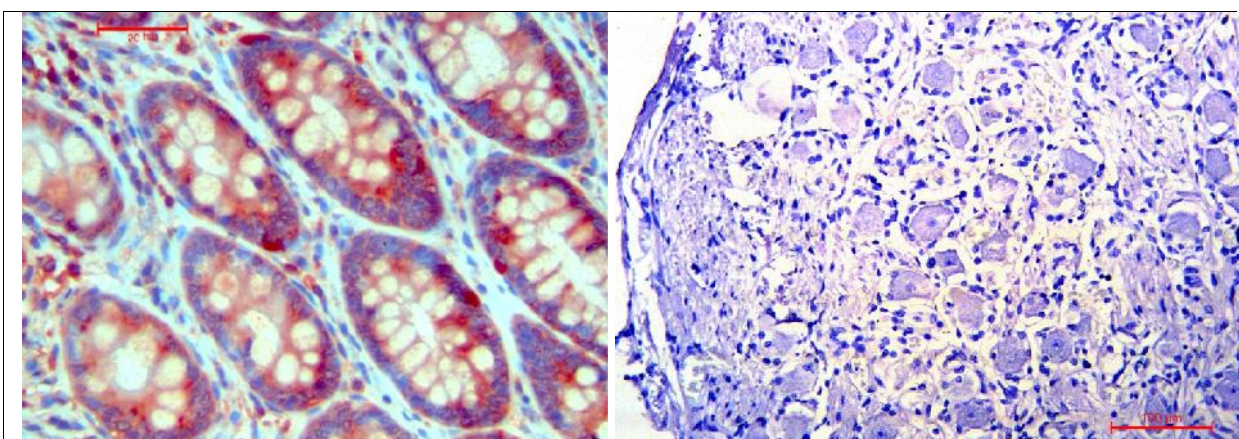
Slika 4.61. Ganglijske elije nisu se bojile antitelom na VIP u toku primene IHH tehnike. (IHH)

Tako e, u ganglijskim elijama nije pokazana ekspresija NPY (slike 4.55 i 4.56), kao ni somatostatina (slike 4.57 i 4.58), dok su se ovi peptidi bojili u kontrolnim uzorcima tkiva oveka.



Slika 4.62. NPY+ neuron u velikom mozgu pacova, na kontrolnom uzorku. (IHH)

Slika 4.63. Hanglijske elije genikulatnog gangliona nisu se bojile sa antitelom na NPY. (IHH)



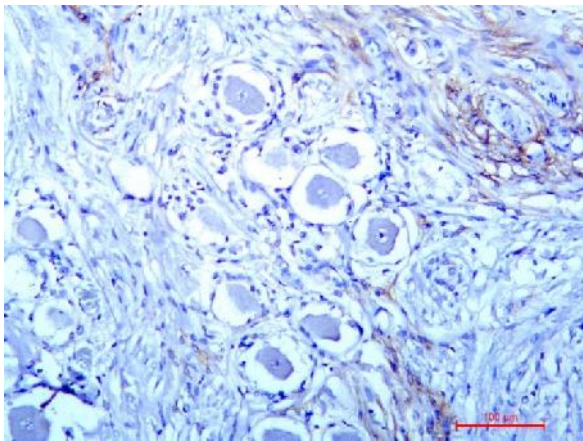
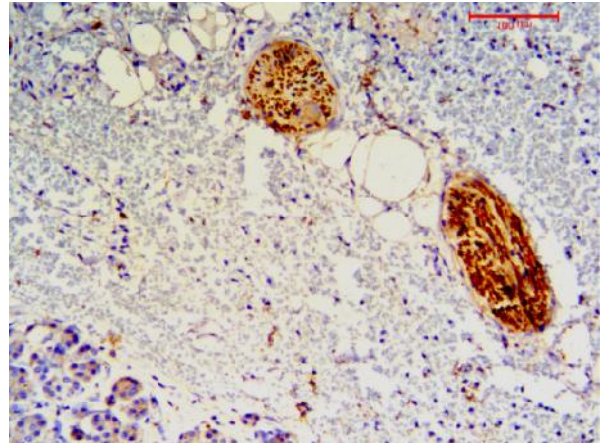
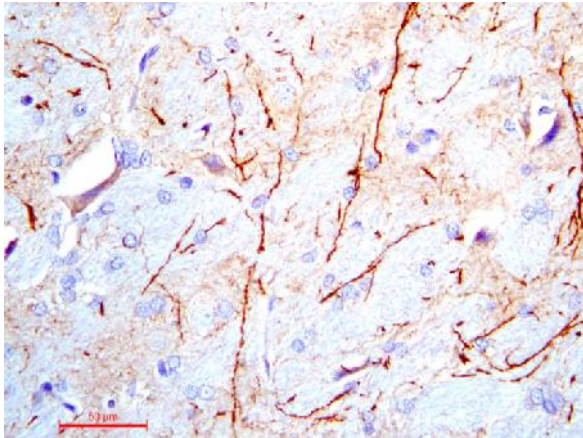
Slika 4.64. Kontrolni uzorak kolona oveka sa obojenim enteroendokrinim elijama koje proizvode somatostatin (strelice). (IHH)

Slika 4.65. Ganglijske elije genikularnog gangliona nisu se bojile sa antitelom na somatostatin. (IHH)

#### 4.7. Indirektna procena ekspresije u ganglionu geniculi neurotransmitera – aktivnost acetilholin-esteraze (AChE), tirozin-hidroksilaze i glutation-sintetaze

Ganglijske elije nisu ekspimirale AchE (slike 3.31 i 3.33 iz poglavlja Materijal i metode), glutamin-sintetazu (slika 3.30 iz poglavlja Materijal i metode), kao ni tirozin-hidroksilazu (slike 3.34-3.36) na preparatima bojenim IHH metodama primenom antitela na ove enzime. Na taj na in smo zaklju ili da ganglijske elije ne sintetišu acetyl-holin (procenjeno na osnovu izostanka bojenja na AchE), GABU (izostanakl ekspresije glutamin-sintetaze) niti dopamin i noradrenalin (izostanak ekspresije tirozin-hidroksilaze).

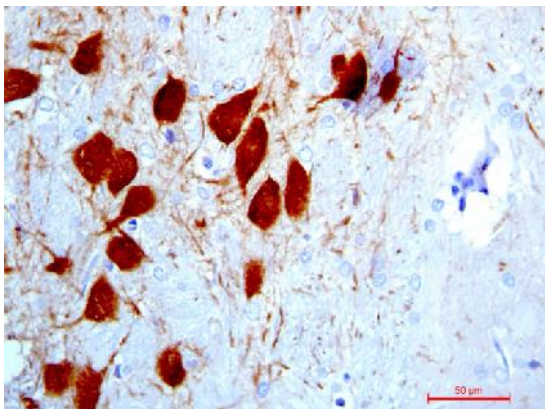




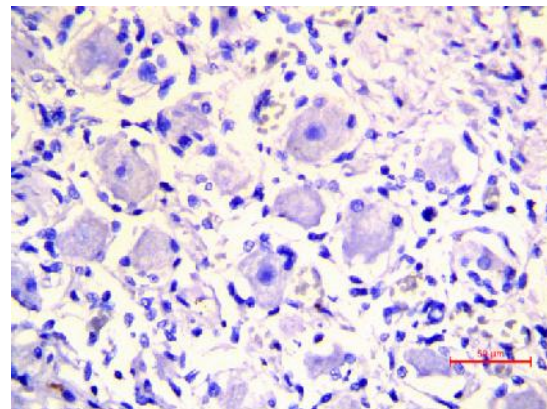
Slike 4.66-4.68. Mreža dopaminergičkih i noradrenergičkih nervnih vlakana u velikom mozgu pacova (levo, gore) i nervni fascikulusi u kapsuli pankreasa oveka (desno, gore). Ganglijske elije se nisu bojile na tirozinhidoksilazu (slika dole). (IHH)

#### 4.8. Ekspresija parvalbumina u *ganglionu geniculi*

Za razliku od kontrolnih uzoraka mozga u kojima se uočavala izrazita ekspresija parvalbumina u neuronima velikog mozga pacova, u ganglijaskim elijama genikulatnog ganglionu ovaj protein se nije ekspimirao (slike 4.69 i 4.70).



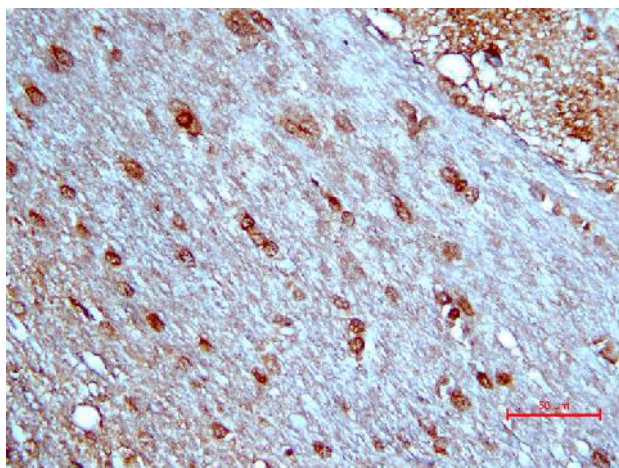
Slika 4.69. Parvalbumin u neuronima velikog mozga pacova. (IHH)



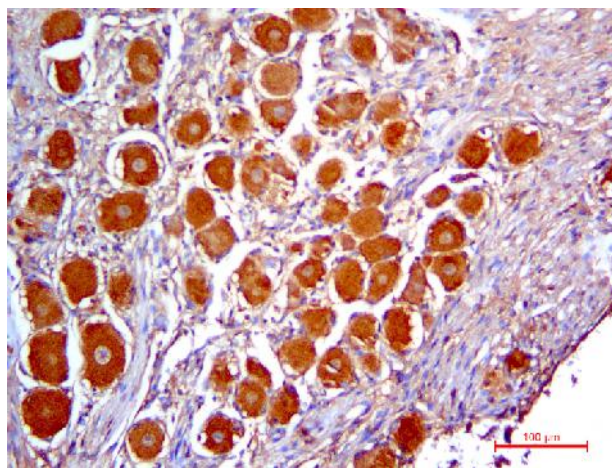
Slika 4.70. Ganglijske elije se nisu bojile na parvalbumin. (IHH)

#### 4.9. Ekspresija Nurra-1 u ganglijskim elijama *ganglionu geniculi*

Transkripcioni faktor Nurr-1 ekspimirao se u ganglijskim elijama *ganglionu geniculi* difuzno, u skoro svim ganglijskim elijama, a intenzitet IHH reakcije bio je snažan/umeren (slike 4.71 i 4.72). Ekspresija je bila predominantno u citoplazmi ganglijskih elija.



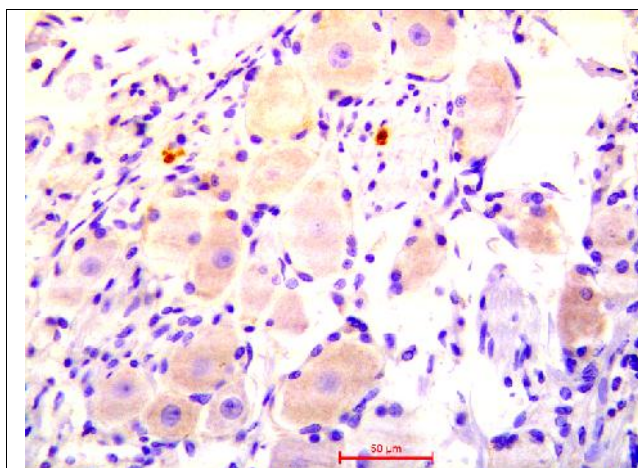
Slika 4.71. Ekspresija Nurr-1 u mozgu pacova, na kontrolnom uzorku. (IHH)



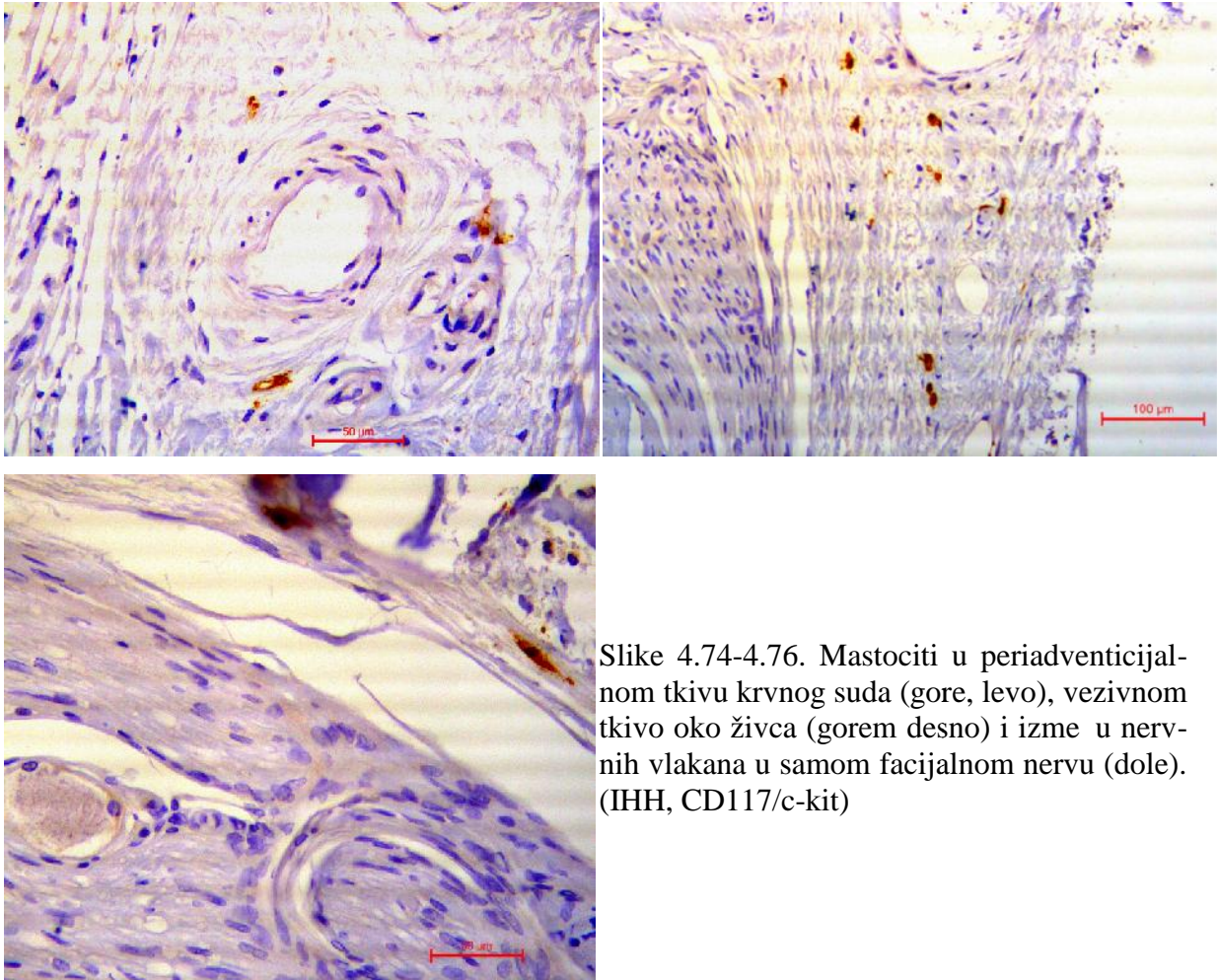
Slika 4.72. Difuzna, izrazita citoplazmatska ekspresija Nurr-1 u ganglijskim elijama genikulatnog ganglionu. (IHH)

#### 4.10. Mastociti u ganglionu geniculi

Mastociti u ganglionu geniculi u interganglijskim prostorima, su bili uobičajena pojava u većini ispitivanih ganglionu u ovoj studiji (slika 4.73).



Slika 4.73. Mastociti u interganglijskim prostorima u ganglionu geniculi, obojeni imuno-histohemijskim bojenjem na CD117/c-kit. (IHH)



Slike 4.74-4.76. Mastociti u periadventicijalnom tkivu krvnog suda (gore, levo), vezivnom tkivo oko živca (gorem desno) i izme u nervnih vlakana u samom facijalnom nervu (dole). (IHH, CD117/c-kit)

Osim u samom ganglionu, mastociti su se u značajnom broju nalazili i u adventiciji krvnih sudova u vezivnom omota u *n. facialis*, kao i izme u nervnih vlakana u samom živcu (slike 4.74-4.76).

## 5. DISKUSIJA

*Ganglion geniculi* sadrži kolekciju neurona iji aksoni, tj. centralni produžeci, formiraju intrakranijalno *nervus intermedius* koji je u sastavu VII kranijalnog živca (*nervusa facialis*) (Toulgoat et al., 2013). Periferni produžeci ganglijskih neurona ulaze u sastav pojedinih ogranaka facijalnog živca.

*Nervus intermedius* (VII bis) pronađen je još daleke 1563. godine, ali je detaljnije opisan tek u 18. veku od strane Heinricha Augusta Wrisberga. Ovaj nemački anatom ga je označio kao *pars media*, jer živac zauzima središnji položaj između *n. facialis* i *n. vestibulo-cochlearis*. Zahvaljujući radu ovog anatoma, nastao je za *n. intermedius* eponimni naziv „Wrisbergov živac” (Tubbs et al., 2013).

Nervus intermedijus anatomski se opisuje u smeru od moždanog stabla ka petroznom delu temporalne kosti. Živac nastaje u *cisternai cerebellopontinai* nakon izlaska iz ponsa zajedno sa facijalnim i vestibulokohlearnim živcima, u blizini najlateralnijeg dela pontomedularnog spoja i ventrokaudalnog dela *pedunculus cerebellaris medius*. Živac je najčešće kompaktan, a retko izlazi pomoću tri ili četiri korenika, U većini slučajeva, živac se pruža paralelno sa VII kranijalnim nervom, ali uz VIII nerv. U 20% slučajeva potpuno je spojen s vestibularnim živcem. Ovaj cisternalni deo nervusa intermedijusa ubrzo prolazi kroz *porus acusticus internus* i postaje meatalni segment. Živac se u meatusu nalazi između *n. facialis* i *n. vestibularis superiora*, u neposrednoj blizini donjeg vestibularnog živca i *a. labyrinthi* ili *auditivae internae*, Ovde započinje i priključivanje *n. intermedius* facijalnom živcu (Rhoton et al., 1968a).

Nakon prolaska kroz *introitus n. facialis* na dnu ovog hodnika, započinje labirintni segment živca koji se nalazi u početnom delu *canalis facialis*. Ovaj segment živca, koji nastavlja horizontalno, i to perpendikularno na uzdužnu osovinu piramide, dug je 2,25-3 mm (Ge and Spector, 1981). Snopci intermedijusnog živca ovde su u sastavu glavnog stabla facijalisa (Tubbs et al., 2013). Oni napuste glavno stablo, ostatak *n. facialis* pravi koleno, a zatim nastavlja put kao timpanični i mastoidni segment. Osim odnosa s facijalnim živcem i ograncima *a. auditivae internae*, labirintni deo nervusa intermedijusa je u bliskom odnosu i sa *cochleaom* i početnim delom *vestibuluma* unutrašnjeg uha i, naravno, sa svojim kolenastim ganglionom. Dužina nervusa intermedijusa od gangliona do moždanog stabla iznosi prosečno 20 mm (Rhoton et al., 1968a).

Sam *ganglion geniculi* leži u nivou prvog kolena facijalnog živca, tj. ispred njegovog temena (Hall et al., 1969; Dobozi, 1975; Ge and Spector, 1982; Captier et al., 2005; Tubbs et

al., 2013). Ganglion ponekad zahvata i sam labirintni segment živca. U retkim slučajevima (12%) ganglijske elije nalaze se pretežno u *meatusu acusticusu internusu* (Rupa et al., 1992). Ganglion leži neposredno iznad baze *cochleae*, ispred *vestibuluma* i medijalno od *recessusa epitympanicusa* (Hall et al., 1969). Spomenuti topografski odnosi gangliona imaju veliki značaj u neurohirurgiji i operativnoj otologiji (Carpirt et al., 2005; Tubbs et al., 2013). Ganglion je, praktično, u kontaktu s najvećim intrapetroznim ogrankom facijalisa, *nervusom petrosusom majorom*, koji se upravo tu odvaja od facijalnog živca, a zatim napušta facijalni kanal prolaze i kroz *hiatus* i *sulcus n. petrosi majoris*. U blizini se nalazi i *n. petrosus minor*. Između gangliona i *cavitas tympani* ponekad ne postoje koštane pločice, te je on u kontaktu samo sa sluznicom bubne duplje. Može da izostane i koštana pločica iznad gangliona (Rhoton et al., 1968b; Ge and Spector, 1982). Inače, opisano je da ganglion ima uglavnom ovalan oblik i prečnik svega nekoliko milimetara (Ge and Spector, 1982).

Sto se tiče **vaskularizacije** facijalisa i *gangliona geniculi*, zapaženo je nekoliko izvora. Tako, meatusni segment i naredni (labirintni) segment *n. facialis*, sa priključenim *n. intermediusom*, snabdevaju granice *a. auditivae internae*, koja se najčešće odvaja od *a. cerebelli inferior anterior*. Timpani ni segment i sam genikulatni ganglion ishranjuju ogranci *ramusa petrosusa* iz *a. meningeae mediae* (Rhoton et al., 1968a; El-Kloulhi et al., 2008, Zaidi et al., 2008). Mastoidni segment facijalnog živca dobija ogranke od *a. stylomastoideae*. Zbog velikog kliničkog značaja vaskularizacije facijalnog živca i gangliona, savremena radiologija omogućila je merenje protoka krvi kroz spomenute sudove primenom laserskog doplerfloumetra.

Navedena petrozna grana odvaja se, kako je spomenuto, od *a. meningeae mediae*, najčešće do 10 mm iznad *foramena spinosuma* (Rhoton et al., 1968a). Pruža se ispod dure mater srednje lobanjske jame, ali može i ispod površinskog koštanog dela piramide slespoo ne kosti. Daje grane za *ganglion geniculi* i za timpani ni deo facijalisa. Oko ovog dela facijalisa i samog gangliona formira se vaskularna mreža. Mreža je mnogo razvijenija u ganglionu nego u živcu (Ge and Spector, 1982).

Inače, *nervus intermedius* u životnom toku formiraju **aferentna i eferentna vlakna**. Aferentna vlakna intermediijusa predstavljaju centralne produžetke aksona ganglijskih neurona. Prema tome, ona polaze iz *gangliona geniculi* i završavaju se u moždanom stablu. Ova nervna vlakna jesu dvostrukog karaktera: somatosenzornog (kožna vlakna) i gustativnog (za prenos senzacija ukusa).

Periferna **somatosenzorna vlakna** pružaju se od odgovarajućih delova kože glave do ganglijskih neurona, a periferne produžetke i predstavljaju. Ona polaze iz kože *auriculae*, odn.

njene *conchae*, retroaurikularnog (mastoidnog) predela i jednog dela *meatus acusticus externus*, a izgleda i iz manjih polja sluznice nazofarinska i *membrane tympani*. Centralni delovi somatosenzornih vlakana formiraju *n. intermedius*, tj. pružaju se od njegovog gangliona do moždanog stabla. Nakon ulaska u pons vlakna se završavaju u *nucleusu tractus spinalis nervi trigemini* (Tubbs et al., 2013).

**Gustativna vlakna** tako e predstavljaju periferne produžetke ganglijskih neurona. Pružaju se od receptorskih elija u gustativnim papilama prednje dve trećine jezika (*papillae fungiformes* i *foliatae*), odakle se prikljuuju *nervusu lingualisu* iz mandibularnog živca. U gornjem zadnjem delu *fossae infratemporalis* ova vlakna napuštaju spomenuti živac i, u vidu *chordae tympani*, ulaze u bubnu duplju prelaze i zatim preko unutrašnje strane bubne opne. Potom ulaze u mastoidni segment *nervusa facialis* i pružaju se kroz njega do svog genikulatnog ganglion. Gustativna vlakna prenose pet osnovnih modaliteta ukusa: slano, slatko, kiselo, gorke i umami.

Centralni produžeci gustativnih neurona takode prolaze kroz *nervus intermedius*. Najveći broj ovih vlakana završava se u rostralnom delu *nucleus tractus solitarii*, koji zbog toga i nosi naziv *nucleus gustatorius* (Carpenter, 1991). Ova vlakna ulaze u sastav ascendentnog sistema, sve do nivoa gustativnih područja korteksa velikog mozga. Manji broj vlakana formira sinapse u drugim delovima istog jedra, kao i u retikularnoj formaciji medule oblongate, te u nekim deo refleksnih krugova za razne oralne motorne aktivnosti.

**Eferentna parasimpatička vlakna** *nervusa intermedius* predstavljaju aksone preganglijskih parasimpatičkih neurona smeštenih u pontinskom jedru *nucleus salivatorius superior* (Carpenter, 1991; Tubbs et al., 2013). Preganglijski aksoni izlaze iz ponsa u sastavu *n. intermedius*, potom u kojeg ulaze u labirintni segment facijalnog živca. Ovde nastaju dva glavna snopa koja formiraju dve intrapetrozne grane facijalnog živca: veliki petrozni živac i hordu timpani.

*Nervus petrosus major* napušta facijalni kanal u predelu kolena, tj. u neposrednoj blizini *ganglion geniculi*. Ovde izlazi na površinu prednje strane piramide temporalne kosti, gde se pruža duž svog kanala (*sulcus n. petrosi majoris*). Napušta intrakranijalni prostor kroz *foramen lacerum*, odakle nastavlja napred prema ulazu u *canalis pterygoideus*. Ovde formira, zajedno s postganglijskim simpatičkim živcem (*n. petrosus profundus*), *n. canalis pterygoidei*. Preganglijska parasimpatička vlakna *n. petrosus major* formiraju sinapse sa ganglijskim elijama u *ganglionu pterygopalatinum* istoimene lobanjske jame. Postganglijska vlakna izlaze iz ovog ganglion i prelaze, duž *nervi pterygopalatini*, u *nervus maxillaris*, pa ubrzo u *n. zygomaticus*, *nn. nasales posteriores superiores* i *nn. palatini*. Vlakna iz *n. zygomaticus*

formiraju u orbiti spojnicu sa suznim živcem, tj, *ramus communicans nervi zygomatici cum nervo lacrimali*. Duž *n. lacrimalis* iz oftalmičke grane trigeminusa postganglijska vlakna dolaze do suzne žlezde i obezbeđuju njenu sekretornu inervaciju. S druge strane, postganglijski aksoni u sastavu spomenutih nazalnih nerava inervišu žlezde nosne sluznice. Najzad, vlakna u sastavu palatinskih nerava inervišu nepčane pljuvačne žlezde. Uz ova vlakna pruža se i izvestan broj gustativnih aksona iz mekog nepca koji se završavaju u genikulatnom ganglionu (Koga and Bradley., 2000).

**Chorda tympani**, tj. njen eferentni deo, nastaje od preganglijskih parasimpatičkih vlakana u samom facijalnom živcu. Ova vlakna izlaze iz mastoidnog segmenta živca, pružaju se po unutrašnjoj strani bubne opne i izlaze iz *cavum tympani* kroz *fissuram petrotympanicam*. Ulaze u gornje-zadnji deo *fossae infratemporalis* i priključuju se *nervusu lingualis* iz mandibularne grane trigeminusa. Vlakna napuštaju donji deo jezičnog živca i ulaze u *ganglion submandibulare* i *sublinguale*. Postganglijska vlakna iz ovih gangliona inervišu istoimene žlezde, tj. *glandula submandibularis* i *sublingualis*, kao i male pljuvačne žlezde (Tubbs et al., 2013; Toulgoat et al., 2013).

Na osnovu do sada izloženih činjenica, jasno je da produžeci neurona u *ganglionu geniculi* pripadaju samo senzornom sistemu, tj. somatosenzornim vlaknima, koja su poznata i pod nazivom opšta somatska aferentna (GSA) vlakna, i gustativnim vlaknima koja su označena i kao specifična somatska aferentna (SSA) vlakna (Carpenter, 1991). Kako je spomenuto, periferni delovi ovih vlakana formiraju ogranke facijalnog živca, u kojima su zastupljeni u različitom broju (Gacek, 1998). Najveći broj senzornih i parasimpatičkih vlakana nalazi se u *chordi tympani* (50%), a manji broj u *n. petrosus major* (20%) i *ramusu auricularis posterior* (21%). Preostala vlakna jesu motornog tipa, te se nalaze u granama za mimiku muskulaturu (8%) i za *n. stapedius* (1%). Centralni produžeci aferentnih vlakana, zajedno s preganglijskim parasimpatičkim aksonima, formiraju *nervus intermedius*. I periferni i centralni produžeci jesu ogranci ganglijskih elija.

Ova studija obuhvatila je proučavanje kako mikroanatomskog topografskog položaja gangliona geniculi, njegove cirkulacije, histološke građe i citoloških osobina njegovih ganglijskih elija, tako i kompleksno ispitivanje imunofenotipa ganglijskih elija u pogledu ekspresije pan-neuronskih markera i neuropeptida i neurotransmitera.

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*). Disekzione analize odnosa GG sa mernim podacima su retke i nepotpune (*Ulug, 2009*). Hirurški pristup kroz srednju lobanjsku jamu se koristi u mnogim stanjima, a vezano za strukture koje smo mi proučavali kod vestibularne neurektomije, dekompresije facijalnog nerva, intrakanalikularnih tumora, kao što su neurom kohlearisa ili neurom facijalisa ili holesteatom petroznog dela temporalne kosti (*Ulug et al., 2005b, 2006*). Korišćenje odgovaraju ih anatomskih orijentacionih tačaka je presudno za pouzdano izvođenje ovih vrlo zahtevnih hirurških zahvata gde nema prostora za grešku jer cilj ove hirurgije nije samo uklanjanje tumora već i otvaranje sluha (*Chopra et al., 2003; Lan et al., 2010*).

esto spominjana struktura koja može da posluži kao orijentaciona tačka za identifikovanje položaja unutrašnjeg slušnog hodnika je GG. Linija postavljena pod pravim uglom na gornju ivicu petroznog dela temporalne kosti koja prolazi kroz GG pokazuje položaj unutrašnjeg slušnog hodnika. Ovo 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*). Kao dobar putokaz za pronalaženje pozicije GG tokom operacije je veliki petrozni nerv koji pouzdano vodi ka ganglionu. Naše 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. Ovaj nalaz ukazuje da bi praćenjem velikog petroznog nerva do mesta njegovog nastanka i dodavanjem oko 11,5 mm upolje perpendikularno na pravac pružanja nerva, hirurški dobio mesto početka zone bezbednog rada na uklanjanju krova unutrašnjeg slušnog hodnika.

*Processus cochleariformis* je u literaturi najčešće spominjana struktura koja je po otvaranju bubne duplje od velike pomoćne i manje iskusnim hirurzima. Rastojanje od ovog nastavka do mesta nastanka velikog petroznog nerva Ulug navodi da je prosečno 5,84 mm (*Ulug, 2009*). Naši rezultati govore da je rastojanje od GG do centralnog dela vrha kohleariformnog nastavka prosečno bilo 5,53 mm. Rezultati su vrlo slični pogotovo ako uzmemo u obzir da su sva merenja na našem materijalu obavljena uz korišćenje preciznog kompjuterskog softvera, za razliku od navedenog autora koji je koristio ručni merač.

Timpanični segment facijalnog nerva, veliki petrozni nerv, kohlea i vestibulum su paralelne strukture i mogu se koristiti za međusobno pozicioniranje. 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). Mi smo kao deo naših analiza merili 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.

Pitanje pukotina i defekata krova koštane lože genikulatnog gangliona je prisutno u opisima ove strukture. Mi smo ovakvu varijaciju uočili u 20% gangliona. Na velikoj seriji od 365 CT snimaka grupa autora je dehisenciju koštane lože uočila u 14,5% slučajeva (Isaacson et al., 2007). Nalaz je u saglasnosti sa incidencijom postojanja ove pojave od 15%, koju su opisali drugi autori (Rhoton et al., 1992).

GG se nalazi neposredno ispred prvog kolena facijalnog nerva, gde labirintni prelazi u timpanični deo. Dok je labirintni segment facijalnog nerva vaskularizovan granama *a. labyrinthi*, granom *a. cerebelli inferior anterior*, mastoidni segment dobija stilomastoidnu granu iz *a. auricularis posterior* ili *a. occipitalis*, a timpanični segment je snabdeven granama petrozne arterije (Balkany et al., 1991a; Minatogawa et al., 1980; Mom et al., 2002). Isti autori opisuju i anastomoze između stilomastoidne i petrozne arterije na stablu nerva (Blunt, 1954; Minatogawa et al., 1980; Takeda et al., 1997).

Opisi vaskularizacije genikulatnog gangliona su retki i uglavnom spominju petroznu arteriju (Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). Naša proširena preliminarna ispitivanja vaskularizacije labirintnog segmenta facijalnog nerva pokazuju da *a. labyrinthi* ne učestvuje u vaskularizaciji genikulatnog gangliona. Međutim, neki autori navode mogućnost da unutrašnja karotidna arterija u karotidnom kanalu ponekad daje grane za vaskularizaciju gangliona (Minatogawa et al., 1980).

*A. petrosa* (AP), koja vaskularizuje timpanični segment facijalnog nerva i genikulatni ganglion (GG), identifikovana je i opisana u XIX veku od strane znamenitog francuskog istraživača i kliničara Jean Cruveilhiera. Bez obzira na poznate podatke mnogo detalja o ovoj arteriji nije bilo poznato do nedavno (El-Khouly et al., 2008). Naši rezultati su u celini slični podacima navedenih autora (Blunt, 1954; Minatogawa et al., 1980; El-Khouly et al., 2008). Pored toga neki novi detalji o ovoj arteriji pokazani su u našoj studiji.

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, prosečno prečnika od 1,3 mm. Jedino El-Khouly i sar. (El-Khouly et al., 2008) na jednom preparatu opisuju veoma malu AMM koja se završavala kao AP. Clarke je uočio neobičan poletak AP od AMM *accessoriae* (Clarke, 1965). U svakom slučaju podvezivanje AMM ili embolizacija maksilarne arterije zbog epistakse, ili davanje hemioterapije u maksilarnu arteriju mogu da ugroze cirkulaciju kroz

petroznu arteriju i da dovedu do slabosti mimi nih miši a (*Blunt, 1954; Takeda et al., 1997; Standing, 2008*).

Grupa navedenih autora (*El-Khouly et al., 2008*) uo ila je da je AP na 4 preparata polazila kao grana AMM ispod nivoa spinoznog otvora. Mi smo u svim slu ajevima na našem materijalu našli identni no supraspinozno, intrakranijalno poreklo AP. U opisanom istraživanju, kao i na našem materijalu, opisan je i slu aj kada trigeminalna arterija, pored vaskularizacije trigeminalnog ganglionu u estvuje i u snabdevanju *n. petrosus majora*. Ošte enje ove grane izazvalo bi funkcionalne poreme aje kako trigeminalnog tako i velikog petroznog nerva (*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.

AP može biti povre ena tokom odizanja dure sa poda srednje lobanjske jame tokom hirurške intervencije pristupanja trigeminalnom nervu, Mekelovoj duplji i trigeminalnom ganglionu i kavernoiznom sinusu (*Blunt, 1954; Chandra et al., 2002; El-Khouly et al., 2008*). Sli no navedenom, jatrogene povrede mogu da nastanu tokom uklanjanja koštanog tkiva u cilju pristupanja elementima unutrašnjeg slušnog hodnika. U tim slu ajevima uklanjanje kosti treba sprovesti što dalje od velikog petroznog nerva, da bi se sa uvao i nerv i njegova arterija pratilja. ak i kompresija AP može dovesti do disfunkcije facijalnog nerva (*Sillman et al., 1994*).

AP tokom svog pružanja daje bo ne grane. Samo naša studija je pokazala broj i veli inu ovih bo nih grana. Tako je broj arterijica namenjenih velikom petroznom nervu varirao od 1 do 3 (prose no 1,3), a njihov pre nik od 0,012 mm do 0,052 mm (prose no 0,024 mm).

Naša studija je jedna od dve analize koje su prikazale broj i pre nike grana AP namenjih vaskularizaciji GG. Samo Clarke (*Clark, 1965*) se u svom radu bavio ovim merenjima i opisao pre nike arterija namenjenih ganglionu, od 60  $\mu\text{m}$  do 80  $\mu\text{m}$ . Naša istraživanja su pokazala da su 1 do 3 grane po ganglionu imale pre nike izme u 18  $\mu\text{m}$  i 56  $\mu\text{m}$ , prose no 29  $\mu\text{m}$ . Ove arterije obi no formiraju gustu, iregularnu vaskularnu mrežu na površini ganglionu. Od ove površinske arterijske mreže polaze tanke gran ice koje ulaze u tkivo ganglionu i formiraju intraganglijsku vaskularnu mrežu.

Uo ili smo 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.

Razlike između u njihovih i naših nalaza imaju više mogućih razloga. Prvo, navedeni autori su koristili histološke ploče bojene hematoksilin-eozinom, dok smo mi primenili mnogo preciznije i pouzdanije, specifično za označavanje endotelnih elija krvnih sudova, imunohistohemijsko bojenje na CD34 marker (*Blunt, 1954; Chan and Lowe, 2002; Bala et al., 2012*). Drugo, navedeni autori su isključivo identifikovali kapilare, dok smo mi brojali sve mikrosudove, tj. i kapilare i prekapilare. Treće, ovi autori su isključili iz brojanja kapilare okolnog vezivnog tkiva, dok smo mi brojali ne samo mikrosudove oko svake ganglijske elije, već i u vezivnom tkivu koje okružuje male grupe neurona. Pošto smo takođe brojali i same ganglijske elije u navedenim mikroskopskim poljima, prosečno 28,1 po polju, uoili smo da prosečan odnos elija/sud iznosi 1:3,6. Drugim rečima, svaka ganglijska elija je okružena sa 3,6 mikrosuda.

Ogledno je da GG ima najbogatiju mikrovaskulaturu u predelu pružanja i inervacije facijalnog nerva (*Blunt, 1954; Clark, 1965; Balkany et al., 1991b*). Na primer, prosečna kapilarna gustina labirintnog segmenta facijalnog nerva je samo 1,5-2,0 po polju, dok timpani ni segment pokazuje gustinu od 2,3-4,0 kapilara, a mastoidni segment 3,3-4,8 kapilara (*Balkany et al., 1991a; Balkany et al., 1991b*). Prema ovim rezultatima labirintni i timpani ni segmenti facijalnog nerva su osetljiviji na ishemiju, što bi u sadejstvu sa edemom nerva dovelo do oštećenja nerva, i što bi bio jedan od patofizioloških mehanizama za razvoj Bellove paralize (*Balkany et al., 1991a; Balkany et al., 1991b*).

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*). Neki autori, takođe, ukazuju da gusta ganglijska vaskularna mreža može da bude i predilekciono mesto za razvoj hemangioma (*Balkany et al., 1991a*).

Naša i istraživanja drugih autora ukazuju da je ogledno da AP ishranjuje kako GG, tako i timpani ni segment facijalnog nerva. To je razlog zbog koga oštećenje ili okluzija AP može da kompromituje vaskularizaciju GG i timpani nog segmenta facijalnog nerva, uključujući i *n. petrosus major*. Kao posledica ovakvih dešavanja može se razviti periferna facijalna slabost ili paraliza, kao i ispad senzibiliteta dela ušne školjke i umanjenje intenziteta doživljaja gustativnih senzacija, suženja i sekrecije nazalnih i palatinalnih žlezda (*Standing, 2008*). Tokom ganglionitisa, izazvanog varicela zoster virusom prisutnim u ganglionu, kao i kod pacijenata sa

genikulatnom neuralgijom, postoji i uklju enost neurona i vaskularizacije ganglionu u patološke promene (Gilden, 2013; Tubbs et al., 2013).

Naša mikroanatomska posmatranja prilikom disekcije uzoraka za histološka ispitivanja genikulatnog ganglionu i segmenata *n. facijalisa* oko ganglionu, pokazala su da je 19 od 20 ganglionu bilo **lokalizovano** na tipu nom mestu, neposredno pre kolena *n. facijalisa*, osim jednog koji je imao 15 ostrvaca elija u labirintnom delu facijalisa, zna i pre kolena ovog nerva. Me utim, detaljnom histološkom analizom uzoraka, u seriji od 20 ganglionu obuhva enih ovom studijom, pokazano je da je samo jedan *ganglion geniculi* bio sastavljen samo od ganglijskih elija organizovanih u “klasi nom” *ganglionu geniculi* lokalizovanom u kolenu facijalnog nerva, a svi ostali ganglionu – 18/20 (90%), imali su akcesorne ganglijske elije razbacane u meatusnom delu (u *n. intermediusu*) –M deo, i/ili u petroznom delu živca (*n. petrosusu majoru*) –P deo. U najve em broju uzoraka obuhva enih ovom studijom, pored postojanja *ganglionu geniculi* u kolenu facijalnog nerva, akcesorne ganglijske elije nalazile su se istovremeno u *n. intermediusu* – u 13/20 (65%) slu ajeva, dok su se preostali slu ajevi odnosili na prisustvo akcesornih ganglijskih elija i u *n. intermediusu* i u *n. petrosusu majoru* (5/20; 25%). Što se ti e broja akcesornih ganglijskih elija on se kretao od 1 do 67 elija po uzorku. Zapaženo je da je broj akcesornih elija, ukoliko se radilo o ganglionima koji su imali akcesorne elije i u *n. intermediusu* i u *n. petrosusu majoru*, bio ve i u *n. intermediusu* u odnosu na *n. petrosusu majoru*.

U literaturi postoji neusaglašena terminologija oko toga kako nazvati ganglijske elije genikulatnog ganglionu koje nisu lokalizovane na tipu nom mestu, tj. u kolenu facijalnog živca. Neki autori ove elije ozna avaju kao **akcesorne** ganglijske elije, neki kao **aberantne**, neki kao **ektopi ne** ganglijske elije, a neki kao **posebne segmente ganglionu geniculi** i opisuju ih kod razli itih životinjskih vrsta (ma ke, pacova, zamorca, majmuna), uklju uju i i oveka.

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 kvantitativnoj i morfološkoj studiji Nawara i sar. (Nawar et al., 1980), na pet genikulatnih ganglionu facijalnog nerva oveka opisane su rasute pojedina ne ganglijske elije lokalizovane izme u *n. petrosusu majoru* i *chordae tympani*. Naime, one su se lako uo avale na histološkim preparatima genikulatnog ganglionu, u *n. petrosusu majoru* (koji se odvaja od prednjeg ugla ganglionu), kao i u *chorda tympani* (koja ina e nastaje od stabla facijalisa koje se odvaja od donje-lateralnog ugla), koja se na dodiru sa ganglionom prezentuje u vidu vrtložnih snopova vlakana u ijem se središtu nalaze rasute ganglijske elije. Me utim, neki autori su u genikulatnom ganglionu oveka opisali aberantne ganglijske elije i u *n. intermediusu* (koji se odvaja od gornje-medijalnog ugla ganglionu) (Van Buskirk, 1945).

Najozbiljniju studiju o prezentaciji *ganglionna geniculi* ne u vidu samo jedne kolekcije elija na tipu noj lokalizaciji, publikovao je Gacek, 1980. godine. On je tu studiju nazvao "O dvojnosti ganglionna facijalnog nerva" (Gacek, 1980). Naime, na uzorku od 100 humanih temporalnih kostiju, se enih horizontalno u celini, samo u jednom slu aju ganglijske elije su bile smeštene samo u "klasi nom" *ganglionu geniculi* (G-komponenta). U svim ostalim slu ajevima (98/100, 98%) ganglijske elije su se nalazile i u metusnom delu facijalisa (tj. u *n. intermediusu*, M-komponenta), a svega u jednom slu aju ganglijske elije bile su raspore ane u meatusnom delu i *n. petrosusu majoru* (P-komponenta). Iz tog razloga Gacek govori o dualitetu *ganglionna geniculi*, tj. o obaveznom prisustvu njegove M-komponente (M-ganglionna). Kada se izdvoji 99 ganglionna u kojima postoji i M komponenta, uo ava se nekoliko "profilna" morfološke prezentacije *ganglionna geniculi*: 66 uzoraka ima G i M komponentu; 32 uzorka ima G, M i P komponentu, a jedan uzorak ima M i P komponentu. Što se ti e predominacije G, M ili P komponente, u 88% slu ajeva dominantna je bila G-komponenta ganglionna, u 8% slu ajeva M-komponenta je imala prevagu nad G, a u 4% slu ajeva G i M-komponenta su bile podjednako razvijene. To zna i da je ak u 12% slu ajeva M-ganglion bio jednak ili ve i po broju elija od G-ganglionna. Što se ti e broja elija u pojedinim segmentima, u svim segmentima ganglionna taj broj se kretao od 589-4.183 elije (prose no 2.162), u G-ganglionu je iznosio 66-4015 (prose no 1713), u M-ganglionu od 1-2764 (prose no 448), a u P-komponenti od 16 do 398 (prose no 103). To zna i da se generalno, najmanje ganglijskih elija nalazilo u P-segmentu, a najviše u G-ganglionu, dok se M-ganglion, po prose nom broju elija nalazi izme u.

Nalaz u ovoj doktorskoj disertaciji akcesornih ganglijskih elija u ak 90% slu ajeva, od ega u 65% po tipu G+M i u 25% slu ajeva po tipu G+M+P, iako na daleko manjem uzorku humanih ganglionna, u skladu je sa opisanom studijom Gaceka. U skladu sa studijom je i nalaz jednog ganglionna koji nije imao tipu G- prezentaciju, ve se prezentovao u visu razbacanih ostrvaca elija u petroznom delu temporalne kosti.

Objašnjenje za postojanje aberantnih ganglijskih elija u genikulatnom ganglionu leži u dualitetu embrionalnog razvoja. Naime, embriološke studije kod ljudi pokazale su da ganglijske elije genikulatnog ganglionna imaju dvojno poreklo. Jedan deo ganglijskih elija poti e od epibrahijalne plakode, koja je derivat površinskog ektoderma drugog brahijalnog (hioidnog) luka, a drugi deo poti e od elija nervnog grebena koje formiraju facijalni primordijum (Moore and Persaud, 2008). Epibrahijalna plakoda daje manji broj elija u pore enju sa facijalnim primordijumom. Naime, najve i broj elija koje se nalaze u facijalnom nervu u toku razvi a, i koje se protežu od G- do M-komponente duž *n. intermediusa*, predstavljaju derivat facijalnog primordijuma. Proksimalna lokalizacija ovih elija nervnog grebena u odnosu na vestibulo-

kohlearni primordijum, inicijalno je utemeljila koncept o postojanju akustiko-facijalnog primordijuma (Streeter, 1906), me utim nalaz da se deo ganglionu koji potiče od vestibularno-kohlearnog primordijuma izdvaja u stvari iz zida oti ke vezikule, potvrdio je različit prirodu facijalnog primordijuma i primordijuma *n. vestibulocochlearisa* (Gasser, 1967), pa je ova teorija napuštena. Kasnije je utvrđeno da se ove dve različite po poreklu populacije elije razlikuju i po fiziološkim karakteristikama: jedne poseduju spontanu aktivnost a druge je nemaju ve se aktiviju stimulusima iz mekog nepca, faringusa i papila jezika. Mnogobrojne studije pokazale su da 15-20% vlakana koja čine stablo *n. facialis* i njegovih grana, čine vlakna koja nisu motorna. Radi se o senzornim vlaknima iz gustatornih korpuskula i senzitivnim vlaknima iz kožne regije vrata i mišićnih vretena facijalnih mišića. Me utim, lokalizacija njihovih neurona nije precizno određena u ganglionu geniculi, pa je moguće da se ove elije pored lokalizacije u G-ganglionu nalaze i u M-ganglionu.

U vezi forme prezentacije ganglionu kao i njegove veličine, mora se razmotriti i uloga neurotrofnih faktora, o kojima je detaljno bilo rečeno u uvodnom delu ove doktorske disertacije. Naime, pokazano je da preživljavanje neurona u toku razvoja, njihov rast i apoptozu određuju određeni neurotrofi na faktora: NGF, BDNF, NT-3 i NT-4 (NT4/5). Ovi proteinski produkti se kombinuju sa visokoafinitetnim receptorima u elijama i to određuje elijsku sudbinu. NGF se kombinuje sa tirozin-kinazom A, BDNF sa tirozin-kinazom B, NT3 sa tirozin-kinazom C i B, i NT4/5 sa tirozin-kinazom B. Postoje mnogobrojni dokazi da elijska sudbina ganglijskih elija koje vode poreklo od epibrahijalne plakode ili od nervnog grebena zavisi od neurotrofnih faktora. Dokazano je da NT3 i BDNF održavaju svaki za sebe čak 65% senzornih neurona *n. facialis*, dok preživljavanje preostalih podržavaju ova dva trofi na faktora zajedno. Nedostatak BDNF dovodi do poremećaja razvoja nervnih elija koje nastaju od ektoderma plakoda, dok nedostatak NT3 dovodi do značajnog gubitka mišićnih vretena. Isto tako, smatra se da je BDNF primarni u održavanju senzornih gustativnih neurona. *Chorda tympani* je grana facijalnog živca koja se prva pojavljuje u toku razvoja, pa se smatra da je BDNF, koji je odgovoran za preživljavanje gustatornih neurona javlja rano u toku razvoja, a pošto periferne grane *n. facialis* dosežu do svojih ciljnih mišića kasnije u odnosu na *chordu tympani*, ekspresija NT-3 u mišićima je odložena. Ova etapna i sukcesivna ekspresija BDNF i NT-3 može biti osnova za razvoj G- i M-komponente ganglionu geniculi putem preživljavanja ili apoptoze ganglijskih elija, a brojnost elija u te dve komponente može da odražava genetički determinisani balans između BDNF i NT-3 (Gacek, 1980).

Što se tiče **imunohistoemijske analize akcesornih ganglijskih elija**, u ovoj doktorskoj disertaciji je zapaženo da su one eksprimirale na sličan način i markere kao i ganglijske elije

samog *gangliona geniculi*, me utim zbog malog broja elija na poprečnom preseku ganglionu, smatrali smo da morfometrijska analiza ne bi bila verodostojna, nego bi tom problemu trebalo posvetiti posebnu studiju gde bi se imunohistohemijske analize primenile na svim presecima koji rekonstruišu kompletan ganglion geniculi. Posebno ističemo da su akcesorne elije eksprimirale SP i CGRP. U studiji Marinkovića i saradnika o ektopnim neuronima korena trigeminusnog nerva, ektopne elije su eksprimirale NSE, PGP9.5, sinaptofizin, protein neurofilamena, CGRP, holecistokinin, somatostatin, SP, VIP, NPY i serotonin. Najveći broj ektopnih neurona eksprimirao je CGRP, SP, CCK i somatostatin, a sugerisana je eventualna uloga sekretornih produkata ektopnih neurona i trigeminalnoj neuralgiji (Marinković et al., 2010). Dalja istraživanja akcesornih elija GG trebala bi da pruže uvid u njihov sekretorni profil kao i u eventualnu ulogu i značaj u patološkim stanjima u kojima centralnu ulogu ima ovaj ganglion.

Što se tiče **oblika ganglionu geniculi** na preseku, najveći broj ganglionu obuhvata njih ovom studijom bio je trouglast – 14/20 (70%), zatim su po učestalosti sledili ovalni ganglionu – 5/20 (25%), dok je samo jedan ganglion (5%) bio sastavljen od grupica razbacanih ganglijskih elija u labirintnom delu facijalisa. Trouglasti ganglionu imali su izgled sličan jednosatranim ili jednakokrakim trouglovima (6/20; 30%) ili su bili “zaobljeno” trouglasti (8/20, 40%).

U literaturi se ganglion geniculi opisuje kao ovalan (Ge and Spector, 1981), ili kao piramidalan (Nawar et al., 1980). U našoj studiji našli smo praktično oba oblika ganglionu – jajasti i piramidalni, ne samo na osnovu makroskopske analize već i na osnovu analize histoloških preparata, s obzirom da se takav zaključak može izvesti na osnovu oblika ganglionu na poprečnom preseku (ovalna forma odgovara jajastom ganglionu u trodimenzionalnom obliku, a trouglasta forma piramidalnom).

Što se tiče **dimenzije ganglionu geniculi** na poprečnom preseku uzoraka obuhvata njih ovom studijom, pokazano je da je prosečna vrednost dužeg prečnika ganglionu iznosila  $1187,957 \pm 31,98 \mu\text{m}$  ( $X \pm SE$ ) (od 1048,420 do 1548,570), kraćeg  $910,008 \pm 28,83 \mu\text{m}$  (od 704,761 do 1076,128), dok je površina preseka ganglionu iznosila  $648,066,112 \pm 1126 \mu\text{m}^2$  (od 418964 do 926.303). Prosečan obim ganglionu bio je  $4094,286 \pm 157,18 \mu\text{m}$  (od 3183,690 do 5923,146). Pojednostavljeno, prečnik *ganglionu geniculi* je oko 1 mm, a njegova površina preseka ispod  $1 \text{ mm}^2$ , dok je obim ganglionu oko 4 mm.

Studija Nawara i saradnika pokazala je da je prosečni dijametar strane trougla koja konstituše bazu piramidalnog humanog *ganglionu geniculi* 1.050 mm, što je u skladu i sa našim nalazima. Volumen ganglionu je po istom autoru  $26 \times 10^7 \mu\text{m}^3$  (Nawar et al., 1980). Nešto veće vrednosti dobili su Xi i Spector, koji su, ispitujući labirintni segment genikulatnog ganglionu kod

fetusa i odraslih pokazali da u kasnijem stadijumu razvija (15-40 nedelja intrauterinog života) genikulatni ganglion kod humanih fetusa pokazuje minimalni rast i ima slične dimenzije kao isti kod odraslih osoba (1,76mm dužina x 1,29 mm širina) (*Ge and Spector, 1981*).

Generalno, po literaturnim podacima **ganglijske elije** u GG slične su drugim senzornim ganglijskim neuronima, npr. onima u ganglionu trigeminusa i u dorzalnim ganglionima spinalnih živaca (senzorni spinalni ganglioni). Ima ih prosečno oko 2000 u jednom ganglionu (*Lundy and Corteras, 1999*). Neuroni pokazuju ovalan ili okruglast izgled i imaju veliko svetlo jedro i tamno jedarce. Razlikuju se svetle i tamne elije koje su nasumično raspoređene u ganglionu i aranžirane u vidu lamela, gde elijski klasteri broje u proseku 6 elija. Ganglijske elije su okružene sa manjim ili većim brojem satelitskih elija, koncentrisanih u najvećem broju slučajeva u jednom koncentričnom krugu (tzv. „kapsula“ ganglijske elije), a izuzetno multilamelarno. Iz podataka u literaturi nije moguće zaključiti da li postoje citomorfološke razlike između somatosenzornih i gustativnih neurona. Inače, neki iz poslednje grupe neurona specifični su za pojedine vrste ukusa, dok drugi reaguju na veću i broj gustativnih modaliteta (*Lundy and Corteras, 1999; Breza et al., 2010*).

Ganglijske elije pripadaju tipu unipolarnih neurona, sa tipičnim izgledom aksonskog brežuljka, dok inicijalni segment aksona ima relativno veliki dijametar i neobimajeno veliki broj mikrotubula koje su uključene u tzv. brzi elijski transport. U ganglijskim elijama akumulirane su mitohondrije sa gustim telima u matriksu (zbog gustih paralelnih naspramno postavljenih kristi), što ukazuje na izuzetno visok stepen oksidativnog metabolizma i jonskog transporta u ovom delu aksona. Postoji strukturna razlika između perifernih i centralnih grana aksona u pogledu proporcije mikrotubula (neurotubula) prema neurofilamentima – neurotubule su značajno brojnije u perifernom okrajku nego u centralnom. Proksimalni deo unipolarnog procesusa je nemijelinizovan, dok je distalni deo mijelinizovan, kao i kod ostalih senzornih ganglija, međutim, mijelinski omotač je relativno tanak u odnosu na prečnik aksona (*Spassova, 1983*).

U ovoj doktorskoj studiji, najveći broj ganglija imao je umerenu celularnost, izraženu semikvantitativnom procenom kao 50-70% ukupne površine preseka *ganglion geniculi*. Ovi rezultati indirektno su u skladu sa podacima koji su pokazali da polovina volumena *ganglion geniculi* pripada elijskoj teritoriji (242.990  $\mu\text{m}^3$ ), a druga neznatno manja polovina intercelularnom prostoru (231.977  $\mu\text{m}^3$ ) (*Nawar et al., 1980*). U našoj studiji uočeno je da je intercelularni prostor ispunjen snopovima mijelinizovanih nervnih vlakana, kao što je uočeno i u



drugim studijama (Spasova, 1983). Pored snopova mijelinizovanih nervnih vlakana, uo avala su se kolagena i retikularna vlakna.

Ganglijske elije u okviru *ganglionu geniculi* u ovoj studiji bile su “upakovane” u vidu elijskih klastera u lamelarnom aranžmanu. Lamele su inili klasteri od 3-5 do nekoliko desetina elija, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Nawar et al., 1980; Spasova, 1983). Na preparatima su se me u elijskim klasterima lako uo avale tamne i svetle elije razli itih veli ina, sa nasumi nim rasporedom u okviru klastera. Važna citološka odlika ganglijskih elija *ganglionu geniculi* zapažena u ovoj studiji je izražena Nisslova supstanca, kao i injenica da ove elije izuzetno retko u svojoj citoplazmi pohranjuju lipofuscin – u dva slu aja od 20 ispitivanih ganglionu (10%). Vakuolizacija citoplazme i jedara ganglijskih elija uo ena je u tre ini ispitivanih ganglionu (6/20, 30%).

Studije drugih autora pokazale su sli ne rezultate u vezi citoloških karakteristika ganglijskih elija. Naime, klasi no je shvatanje da su svetle i tamne elije uobi ajena pojava u *ganglionu geniculi*. Taj fenomen, koji se dobro uo ava kako na preparatima obojenim hematoksilin-eozinom, tako i na preparatima obojenim krezil-violetom po *Kluver-Barreri* (kojim se dobro prikazuje Nislova supstanca), poti e od druga ijeg rasporeda Nislove supstance u ovim elijama. Naime, u malim tamnim elijama, granulirani endoplazmati ni retuikulum i ribozomi su gusto upakovani i skoncentrisani na periferiji elije (velika ostrva Nislove supstance), a elije okružuje jedan red satelitskih elija. Nasuprot tome, svetle elije imaju diskretnu Nisslovu supstancu pravilno raspore anu u citoplazmi. U našoj studiji nije uo ena dominacija ni jedne od opisanih elija niti specifi nost u rasporedu u okviru ganglionu, što je u skladu sa drugim studijama (Nawar et al., 1980; Spasova, 1983; Moriyama et al., 1994), me utim treba ista i da je suprotno od nalaza drugih autora, pokazano da je proporcija tamnih prema svetlim elijama manja nego u drugim senzornim ganglijama. Funkcionalna razlika izme u svetlih i tamnih neurona u senzornim ganglijama još uvek je predmet debata. Neki autori smatraju da su male tamne elije visceralni aferentni neuroni (Crosby et al., 1962), tj. da su male tamne elije u spinalnim senzornim ganglijama i trigeminalnom ganglionu nociceptivni neuroni (Gobel, 1974). Kakva je uloga svetlih i tamnih elija u *ganglionu geniculi* nije do danas rasvetljeno.

Ganglijske elije u ovoj studiji bile su pretežno **elipsoidnog oblika** na popre nom preseku. Prose ni **dijemetar** iznosio je  $34,21 \pm 0,69 \mu\text{m}$  (X+SE), sa rasponom vrednosti od 17,740 do 49,113  $\mu\text{m}$ . Prose ni duži dijemetar ganglijske elije je  $37,02 \pm 0,79 \mu\text{m}$  (od 19,842 do 57,374  $\mu\text{m}$ ), a kra i  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$  (od 15,637 do 48,884  $\mu\text{m}$ ). Prose na površina ganglijskih elija je

944,84±36,93  $\mu\text{m}^2$  (od 243,696 do 1894,372  $\mu\text{m}^2$ ). 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 dijametrom od 41-50  $\mu\text{m}$  (16/100; 16%). Prosečan broj satelitskih elija koje prate ganglijske elije je 6,55±1,58 (od 4-11), i one su u najvećem broju slučajeva raspoređene u jednom koncentričnom sloju (95/100; 95%), a samo u dva slučaja u ovim istraživanjima satelitske elije su bile raspoređene u dva koncentrična sloja oko tela neurona (5%). Jedra ganglijskih elija takođe su bila elipsoidnog oblika, sa prosečnim dijametrom od 11,07±0,18  $\mu\text{m}$  (X±SE) (raspon od 7,877  $\mu\text{m}$  do 15,504  $\mu\text{m}$ ). Duži dijametar iznosio je 11,59±0,18  $\mu\text{m}$  (7,921 do 16,208  $\mu\text{m}$ ) a kraći 10,56±0,16  $\mu\text{m}$  (7,278 do 14,800  $\mu\text{m}$ ). Prosečna površina jedara ganglijskih karakteristika iznosila je 98,21±2,94  $\mu\text{m}^2$  (X±SE) (48,870 do 188,391  $\mu\text{m}^2$ ). Jedra su bila heterohromatinska i obavezno sadržala jedarca.

Prikazani rezultati u skladu su sa studijom Moriyame i sar. u pogledu blago elipsoidnog oblika ganglijskih elija. Naime na osnovu originalne formule tzv. cirkularnog koeficijenta (CR=4  $\pi$  A/L<sup>2</sup> gde je A= površina u  $\text{mm}^2$ , L=perimetar u mm), došlo se do podatka da je on manji od 1 kod ganglijskih elija *ganglion geniculi* (0,9), što odgovara blagom elipsoidnom obliku. U slučaju apsolutno pravilnog kruga taj broj je 1 (Moriyama et al., 1995). Van Bruskirk je pokazao da je se vrednost dužeg dijametra ganglijskih elija kod oveka kreće u rasponu od 25-49  $\mu\text{m}$  (Van Bruskirk, 1945), a Nawar i sar. da je prosečni duži dijametar elije 34  $\mu\text{m}$ , a kraći 26  $\mu\text{m}$  (Nawar et al., 1980). Nalazi Nawara su bliži našim nalazima od podataka koje je o humanom ganglionu geniculi izneo Van Bruskirk.

Ova studija pokazala je klasičan nalaz što se tiče markiranja neurona sa pan-neuronskim markerima – NSE, Sy, PGP9.5 i S-100 protein, da se ovim markerima boji oko 85-90% nervnih elija. Međutim, bio je interesantan nalaz ekspresije pan-neuronskog markera NeuN.

**NeuN** (*Feminizing Locus* na X-3, Fox-3, Rbfox3, ili *Hexaribonucleotide Binding Protein-3*), homolog gena koji determiniše pol kod *Caenorhabditis elegans*, je nukleusni antigen neurona, koji se često koristi kao njihov biomarker.

NeuN je prvi put opisan 1992 (Mullen et al., 1992), a naučnici su za cilj imali da proizvedu monoklonska antitela na mišje antigene s izvornom namerom pronalaženja specifičnih vrstu mišjih imunoloških markera koji bi mogli da se koriste u ogledima transplantacije. Pri ovim ogledima izolovana je hibridna linija, nazvana mAb A60, koja se vezuje za antigen eksprimiran samo na nukleusima neurona, i u manjem stepenu u njihovoj citoplazmi, i to kod svih kičmenjaka. Ovaj nepoznati antigen je stoga poznat kao NeuN – antigen za neuronska jedra

(engl. Neuronal nuklei, NeuN). Godine 2009. Kim i sar. koriste i proteomsku metodu dokazali su da NeuN odgovara proteinu poznatom kao Rbfox3 (Kim et al., 2009). Analiza *Vestern-blotting* pokazala je da postoje dve izoforme NeuN (od 60 i 45 kDa) i da su kodirane iz istog gena alternativnim splajsingom.

NeuN je u širokoj upotrebi kod obeležavanja neurona. Samo 2014. godine objavljeno je 21.914 članaka u stručnoj i naučnoj literaturi o ovom proteinu. Međutim, poznato je da se nekoliko tipova neurona ne obeležava sa NeuN (Purkinjeove i Goldžijeve ćelije, olfaktorne ćelije, fotoreceptori retine i gama-motorni neuroni). I pored toga, ogromna većina neurona boji se sa antitelima na NeuN. Zato se metoda bojenja neurona sa NeuN široko upotrebljava kod identifikacije neurona u ćelijskim kulturama i tkivnim presecima, kao i kod određivanja odnosa neuroni/glija ćelije u mozgu.

Rezultati bojenja ganglionia sa NeuN u ovoj studiji pokazali su da samo 3/20 ganglionia (15%) pokazuje bojenje na ovaj jedarni protein neurona, pri čemu se u obojenim ganglionima boji samo manja populacija ganglijskih ćelija (od 20 do 50%). U literaturi nema podataka o primeni ovog neuronskog markera u identifikaciji ganglijskih ćelija genikulatnog ganglionia. S obzirom da je poznato da NeuN postaje jače eksprimiran kako neuroni sazrevaju, tipično nakon regulacije nishodno ekspresije *dublecortina* (markera neurona u ranom stadijumu embronalnog razvoja), naša razmišljanja mogla bi da teku u pravcu heterogenosti neurona genikulatnog ganglionia u pogledu njihove zrelosti.

Senzorni neuroni su heterogeni u pogledu morfološkog izgleda, imunohistohemijskih i receptorskih karakteristika. Većina velikih neurona sa mijelinskim Ad-vlaknima sadrži neurofilamentni protein od 200 kD (NF200), dok neki mali aferentni neuroni mogu da vezuju izolektin B4 (IB4). Takođe, senzorni neuroni sadrže različite tipove tirozin kinaznih receptora (TrkA, B and C) i neurotransmitera. Neuropeptidi su generalno smešteni u malim ganglijama i onim srednje veličine. Tokom ranog razvoja, koncentracija TrkA se smanjuje, a procenat NF200-, IB4-, SP- CGRP-positivnih neurona se povećava. Već je istaknuto da je taj razvoj zavisen od dejstva i uticaja neurotrofina (Masliukov et al., 2013).

Što se tiče neurotransmitera i neuropeptida, u eksperimentalnim uslovima zapaženo je da je veliki broj ganglijskih neurona (oko 80%) senzitivan na supstancu P (SP) i na gama-aminobuternu kiselinu (GABA) (Koga and Bradley., 2000). Ove supstance oslobađaju se u sinapsama između centralnih produžetaka ganglijskih ćelija i neurona u *nucleus tractus solitarii*, naročito onih koji se projektuju u pontinski gustativni centar (*nc. parabrachialis medialis*). Dok SP ima ekscitatorno dejstvo, GABA je uključena u presinaptičku inhibiciju u spomenutom jedru, ali i u predelu gustativnih papila jezika. Eksperimentalni podaci pokazuju da su samo pojedini

ganglijski neuroni senzitivni na acetilholin (ACh). S druge strane, neki neuroni imaju glutamatske (Glu) receptore (Koga and Bradley, 2000; Caicedo, 2004). Kada je u pitanju serotonin (5-HT), on je verovatno periferni neurotransmiter, tj. luči se i se izmeđuje u gustativnih receptora i gustativnih nervnih vlakana.

U vezi neuropeptida i sli sli supstanci, 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. Inače, neke ganglijske elije sadrže receptore za kapsaicin, koji je aktivni sastojak ljute paprike (Katsura et al., 2006). Naravno, ganglijske elije poseduju i odgovarajuće neurotrofne i transkripcione faktore.

Lokalizacija tahikinina u podskupovima primarnih senzornih neurona trigeminalnog ganglionu, senzornih spinalnih ganglija i ganglija n. vagusa, tema je od velikog interesa za proteklih 60 godina, od kada se pretpostavilo da SP i NKA igraju važnu ulogu u prenosu na nivou prve sinapse u nociceptivnom putu. Neuroni koji sadrže tahikinine u senzornim ganglijama imaju mala elijska tela s nemijelizovanim C-vlaknima ili tankim mijelinizovanim A -vlaknima i sporim brzinama sprovođenja. Ti neuroni posreduju u nociceptivnim odgovorima na fizičke (toplotne i mehaničke) i hemijske nadražaje. Osim toga, oslobođanje neuropeptida iz perifernih nervnih završetaka, oni dovode do nastanka “neurogene inflamacije”, koja podrazumeva dilataciju arteriola i izlivanje plazme, i granulocitnu infiltraciju iz postkapilarnih venula. Primenom imunohistohemijskih tehnika bojenja je pokazano da SP-IR i NKA-IR neuroni, koji predstavljaju 30-50% neurona DRG pacova, koeksprimiraju više neuropeptida. Međutim, postoje uverljivi dokazi za otpuštanje neuropeptida iz nervnih završetaka neurona CNS i PNS, što je preduslov za njihovu fiziološku funkciju, samo za mali broj peptida, među kojima su SP i CGRP.

Peptidergi koji senzorni neuroni poseduju TRP-jonske kanale, uključuju i termosensitivne TRPV1, TRPV2, TRPV3 i TRPV4, senzor za mentol TRPM8, senzor iritacije TRPA1. Jednom aktivirani, TRP-jonski kanali izazivaju oslobođanje neuropeptida, uključuju i tahikinine. Zapažanje da hronično davanje TRPV1-agonista kapsaicina iscrpljuje neuropeptid iz senzornih nerava, ukazuje da svi peptidergi koji neuroni eksprimiraju TRPV1. Štoviše, TRPA1- pozitivni neuroni su sastavni deo neuronske populacije TRPV1, sa TRPA1 lokaliziranim na peptidergi koji neuronima. Međutim, deo ne-peptidergi koji neurona takođe eksprimira TRPA1. Zreli senzorni neuropeptidi se sintetisu od pre-pro-hormona u telu neurona, odakle se aktivnim transportom prenose do centralnih i perifernih nervnih završetaka, gde se pohranjuju u tamnim

sekretornim vezikulama. Neurotrofini, uključujući i NGF, regulišu ekspresiju neuropeptida u senzornim neuronima, kao i sam razvoj neurona.

Identifikovana su dva načina otpuštanja neuropeptida iz perifernih nervnih završetaka peptidergičkih senzornih neurona. Prvi podrazumeva indukciju *in vitro* putem EFS i moguće *in vivo* putem antidromne invazije propagiranog akcionog potencijala na terminalne regione nervnih vlakana, što dovodi do odgovora koji je senzitivniji na tetrodotoksin i koji je posredovan sa neuropeptidima. Ovaj put nudi neurohemijsku i jonsku osnovu za hipotezu Baylissa i Lewisa, pri čemu ozleda uzrokuje snažan neurogeni odgovor, za koji danas znamo je posredovan sa CGRP otpuštenim iz kožnih perivaskularnih senzornih nerava. TRPV1-agonist kapsaicin aktivira drugi tetrodotoksin-nezavisan put oslobađanja neuropeptida, i pruža uvid u funkciju peptidergičkih senzornih neurona. Identična razlika postoji u aktivaciji otpuštanja neuropeptida iz centralnih završetaka primarnih senzornih neurona u odgovoru na periferne nadražaje. Međutim, iako nema sumnje da je oslobađanje neuropeptida iz perifernih završetaka senzornih neurona izaziva neurogenu inflamaciju, ostaje nejasan patofiziološki značaj centralnog oslobađanja tahikinina u nocicepcijskoj transmisiji.

NKRs se ekspimiraju u neuronima DRG i u dorzalnom rogu kičmene moždine. Primarni senzorni neuroni ekspimiraju kako NK1R tako i NK2R koji mogu poslužiti kao autoreceptori za SP i NKA koji se otpuštaju iz istih neurona. Zato Ca<sup>2+</sup>-zavisno otpuštanje SP pojačava aktivnost TRPV1 neurona u DRG, na autokrini način aktiviranja NK1R i NK2R. PKC- posreduje u NK1R-zavisnoj senzibilizaciji TRPV1, verovatno putem fosforilacije TRPV1 i poremećajem ulaznih kanala. NK1R i NK2R se takođe ekspimiraju u neuronima dorzalnog roga kičmene moždine, gde se SP / NKA oslobađaju iz centralnih projekcija primarnih senzornih neurona mogu aktivirati NKRs na spinalnim neuronima i indukovati endocitozu. Osim toga, medijatori oslobađanja lokalno unutar kičmene moždine mogu stimulisati oslobađanje tahikinina i time aktivirati NKRs u kičmenoj moždini. Tako se aktivnost u citokroma P-450 u kičmenoj moždini može generisati 5', 6'-epoxyeicosatrienoic kiselina, koja aktivira TRPV4 na DRG neuronima da oslobode senzorne neuropeptida. Jedna posledica aktivacije NK1R je nastajanje slobodnih kiseoniknih radikala – ROS. U DRG neuronima, intracelularni put posredovan sa ROS povećava M-tip K<sup>+</sup>-kanala i time stoji u kontrateži sa sposobnošću u SP da senzibilizira TRPV1 i indukuje toplotnu preosjetljivost. Ovaj mehanizam može da objasni nalaz da SP uzrokuje hiperalgeziju a ne i akutnu nocicepciju. Međutim, senzibilizacijski učinak SP na neurone nije ograničen samo na TRPV1, jer aktivacija NK1R senzibilizira P2X3 kanale trigeminusnih nociceptivnih, ne-peptidergičkih neurona.

Veliki broj dokaza podržava stav da SP i NK1R doprinose i percepciji bola i hiperalgeziji kod ogleđnih životinja. Tako delecija *Tac1* gena oslabljuje umeren do intenzivni bol i spreava neurogeni inflamaciju, a delecija NK1R suprimira bol izazvan stresom. Me utim, u klini kim ispitivanjima, NK1RA nisu pokazali analgeti ko dejstvo, a danas je potvr eno da od svih neuropeptida oslobo enih iz C-vlakana, CGRP najviše doprinosi nastanku bola kod tipi ne migrene. Me utim, uprkos negativnim rezultatima klini kih ispitivanja, eksperimentalne studije i dalje podržavaju ulogu za SP i NKRs u modulaciji bola i hiperalgezije, iako je njihova uloga verovatno suptilnija nego što se ranije smatralo.

Normalno, A - i C-vlakna prenose bol dok A $\beta$  vlakna prenose dodir. Me utim, nakon povrede živca, i A $\beta$  vlakna mogu prenositi bol. U modelima zapaljenjskog i neuropatskog bola, SP je regulisan uzvodno u debelim nervnim vlaknima. Intraplantarna injekcija karagenana dovodi do proizvodnje u ki menoj moždini hepoxilina A3 od 12-lipoksigenaze, koji poveava otpuštanje SP i doprinosi nastanku zapaljenjske hiperalgezije preko TRPV1 i TRPA1. U hroni nom modelu ošte enja nerva putrem konstrikcije, dolazi do eksprimiranja NK1R u neuronima ki mene moždine, što tako e može da pojaa bol. Studije sa *Tac1*-deficijentnim miševima pokazuju doprinos SP na nastanak bola izazvanog dejstvom formalina i intraplantarno datog kapsaicina, iako je taj doprinos mali i prolazan. U mišjem modelu periferne dijabeti ke neuropatije, poveana ekspresija SP u presinapti kim senzornim vlaknima koja inervišu I-III lamine povezana je sa sa poja anom ERK1 / 2 fosforilacijom i indukcijom drugih markera aktivacije nociceptivnih puteva.

Intraplantarni i intratekalni pretretman sa NK1RA CP96345 inhibira toplotnu hiperalgeziju izazvanu uljem iz senfa i nocifensivno ponašanje. Periferna upala indukovana intraplantarnom aplikacijom formalina aktivira kaskadu intracelularnih zbivanja u NK1R-pozitivnim neuronima ki mene moždine koji mogu dovesti do hiperalgezije, ukljuuju i PI3K, Akt, mTOR. Intraplantarna aplikacija karagena tako e uzrokuje NK1R-zavisnu aktivaciju PI3 i Akt u neuronima zadnjeg roga ki mene moždine.

Nekoliko analgetika može da deluje putem modulacije peptidergi kih neurona. Me u antagonistima Ca<sup>2+</sup>-kanala, samo *ziconotide* smanjuje internalizaciju NK1R potaknutu delovanjem štetnih inilaca. Kod nocicepcije uzrokovane formalinom, neophodni su vezikularni glutamatni transporteri u Nav1.8Cre-pozitivnim neuronima i SP. Intratekalna aplikacija neurotoksina botulinuma- B inhibira otpuštanje SP iz primarnih aferentnih senzornih vlakana ki mene moždine i prigušuje nastali nociceptivni odgovor u modelima upalnog i neuropatskog bola.

Kona no, SP je povezana sa intrinzi nim putevima ki mene moždine koji moduliraju bol, s obzirom da nishodna facilitacija iz rostralno-medijalno-ventralne medule oblongate doprinosi olakšavanju nociceptivnog prenosa i hiperalgezije preko NK1Rs. Pokazano je da suprotnu ulogu ima SP u *locusu coeruleusu*, gde aktivacija NK1R olakšava spinalnu noradrenergi ku transmisiju i prigušuje mehani ku alodiniju nakon hroni ne ozlede.

Aferentna vlakna prenose informacije ukusa iz prednjeg dela jezika i mekog nepca putem *chorde tympani* i *n. petrosusa majora*, a tela neurona smeštena su u kolenom ganglionu *n. facialisa* (GG), dok su gustativni korpuskuli u zadnjem delu jezika inervisani sa *n. glosopharingeusom*, a tela neurona nalaze se u petroznom ganglionu (PG). Elektrofiziološke studije sa hordom timpani, *n. petrosusom* majorom i *n. glosofaringeusom* su pokazale da ti nervi imaju heterogene odgovore na ukusne draži (*Frank 1991; Frank i sur, 1988; Nejad 1986; Ogawa i sur, 1968*), ali nije poznato je li se te razlike ogledaju u nekom biofizi kim svojstvima ganglijskih elija. Osim što poseduju heterogene odgovore, aferentni gustatorni neuroni ekasprimiraju ve i broj neurotransmitera i neuromodulatora. Na primer, imunohistohemijskim analizama je pokazano da se u PG ekspirimira SP, tirozin-hidroksilaza, VIP, CGRP, galanin, glutamat i asparat. 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*). Osim toga, King i sar. pokazali su da SP pobu uje neurone rostralnog gustatornog dela *nc. tractus solitarii* (rNST), što ukazuje da SP može biti uklju en u aferentni prenos informacija ukusa na prvoj centralnoj sinapsi u gustatornom putu (*King et al., 1993*). Sli no tome, pokazano je da GABA ima veliki uticaj na obradu gustatornih informacija u rNTS a taj uticaj može da se delimi no ostvari preko presinapti ke inhibicije na primarnoj aferentnoj ekscitatornoj sinapsi.

Trenutno, neurohemijske karakteristike aferentnih gustatornih vlakana nisu poznate niti je poznat mehanizam sinapti ke transmisije izme u gustatornih korpuskula i primarnih aferentnih vlakana. Istraživanja perifernih kožnih aferentnih vlakana na izolovanim neuronima DRG, pokazala su da ova vlakna imaju hemosenzitivna svojstva (*Dray, 1996*). Mogu e je, stoga, da su receptori na distalnim aferentnim vlaknima koji inervišu meko nepce sli ni onima nazna enim u ovom istraživanju koji se odnose na izolovane ganglijske neurone PG i GG. Dakle, neuronska transmisija izme u glosofaringealnaog živaca i gustatornih korpuskula može biti posredovana sa ACh, SP, 5HT i GABA, dok je transmisija iz gustatornih korpuskula koje inerviše facijalni živac posredovana sa 5HT i GABA, ali ne i sa ACH i SP. Naravno, neurotransmiteri koji nisu obuhva eni ovim istraživanjem tako e mogu biti uklju eni u tu transmisiju. Taj pristup korištenja izolovanih ganglijskih elija u ispitivanju neurotransmisije iz

gustatornih korpuskula, omogućuje praktičan pristup onome što je dugo bilo tehnički problem (Koga and Bradley, 2000).

Ne samo da su navedene neurohemijske supstance prisutne u PG i GG, već su uključene u funkciji centralnog i perifernog stvaranja ukusa u perifernom gustatornom sistemu. Veruje se da serotonin modulira hemosenzorni odgovor gustatornih receptora a ACh, GABA i SP se smatra da funkcionišu u sinapsama između gustatornih receptora i primarnih aferentnih neurona. Štaviše, neuroni PG odgovaraju na ACh pri koncentracijama u fiziološkom rasponu. Na prvoj stanici u centralnom gustatornom putu, pokazalo se da GABA i SP funkcionišu kao inhibitorni i ekscitatorni neurotransmiteri u sinapsi primarnih aferentnih vlakana u *nc. tractus solitarii* (Caicedo et al., 2004; Chaundhari, 2014; Bradley and King, 2007).



## 6. ZAKLJU CI

Rastojanje od *ganglion geniculi* (GG) do mesta najkonveksnijeg dela unutrašnje karotidne arterije u karotidnom kanalu iznosilo je prose no 9,87 mm.

Rastojanje od GG do centralnog dela vrha kohleariformnog nastavka bilo je prose no 5,53 mm.

Distanca od GG do centralne ta ke glave uzengije bila je prose no 7,95 mm.

Rastojanje od GG do mesta odvajanja velikog petroznog nerva od facijalnog nerva bilo je prose no 1,24 mm.

Distanca od GG do najispup enije centralne ta ke promontorijuma iznosila je prose no 7,63 mm.

Rastojanje od GG do stilomastoidnog otvora bilo je prose no 16,92 mm.

Rastojanje od GG do središnjeg dela vrha piramidalnog ispup enja bilo je prose no 8,77 mm.

Rastojanje od GG do ulaznog otvora petrozne arterije iznosilo je prose no 5,4 mm.

*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 od 1 do 3, prose no 1,3 grane namenjene velikom petroznom nervu, a njihov pre nik je varirao od 0,012 mm do 0,052 mm, prose no 0,024 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 je varirao od 87 do 143, prose no 99,8. Njihov pre nik se kretao od 5,47  $\mu$ m do 8,71  $\mu$ m, prose no 6,84  $\mu$ 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.

Histološka ispitivanja GG pokazala su da je 19 od 20 gangliona bilo *lokalizovano* na tipi nom mestu, neposredno pre kolena *n. facialis*, osim jednog koji je imao 15 ostrvaca elija u labirintnom delu facijalisa.

Ve ina GG, 18/20 (90%), imali su akcesorne ganglijske elije razbacane u meatusnom delu (u *n. intermediusu*) – M deo, i/ili u petroznom delu živca (*n. petrosusu majoru*) – P deo.

Broj akcesornih ganglijskih elija se kretao od 1 do 67 elija po uzorku.

Najve i broj 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 elija u labirintnom delu facijalisa.

Prose na vrednost dužeg pre nika gangliona iznosila je  $1187,957 \pm 31,98 \mu\text{m}$  (od 1048,420 do 1548,570), kra eg  $910,008 \pm 28,83 \mu\text{m}$  (od 704,761 do 1076,128), dok je površina preseka gangliona iznosila  $648066,112 \pm 1126 \mu\text{m}^2$  (od 418964 do 926303). Prose an obim gangliona bio je  $4094,286 \pm 157,18 \mu\text{m}$  (od 3183,690 do 5923,146). Pojednostavljeno, pre nik *gangliona geniculi* je oko 1 mm, a njegova površina preseka ispod  $1 \text{ mm}^2$ , dok je obim gangliona oko 4 mm.

Najve i broj gangliona imao je umerenu celularnost, izraženu semikvantitativnom procenom kao 50-70% ukupne površine preseka GG.

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  $37,02 \pm 0,79 \mu\text{m}$  (od 19,842 do 57,374  $\mu\text{m}$ ), a kra i  $31,39 \pm 0,68 \mu\text{m}$  (od 15,637 do 48,884  $\mu\text{m}$ ). Prose na površina ganglijskih elija iznosila je  $944,84 \pm 36,93 \mu\text{m}^2$  (od 243,696 do 1894,372  $\mu\text{m}^2$ ).

Pokazano je da najve i 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%).

Prose an broj satelitskih elija koje prate ganglijske elije bio je  $6,55 \pm 1,58$  (od 4-11), i one su u najve em broju slu ajeva raspore enje u jednom koncentri nom sloju (95/100; 95%).

Jedra ganglijskih elija tako e su bila elipsoidnog oblika, sa prose nim dijametrom od  $11,07 \pm 0,18 \mu\text{m}$ , (raspon od  $7,877 \mu\text{m}$  do  $15,504 \mu\text{m}$ ). Duži dijametar iznosio je  $11,59 \pm 0,18 \mu\text{m}$  ( $7,921$  do  $16,208 \mu\text{m}$ ) a kra i  $10,56 \pm 0,16 \mu\text{m}$  ( $7,278$  do  $14,800 \mu\text{m}$ ). Prose na površina jedara ganglijskih karakteristika iznosila je  $98,21 \pm 2,94 \mu\text{m}^2$ , ( $48,870$  do  $188,391 \mu\text{m}^2$ ). Jedra su bila heterohromatinska i obavezno sadržala jedarca.

Naša studija je pokazala klasi an nalaz što se ti e markiranja neurona sa pan-neuronskim markerima – NSE, Sy, PGP9,5 i S-100 protein, da se ovim markerima boji oko 85-90% nervnih elija. Me utim, bio je interesantan nalaz ekspresije pan-neuronskog markera NeuNu.

Nalaz ekspresije pan-neuronskog markera NeuNu u ovoj studiji je pokazao da samo 3/20 gangliona (15%) pokazuje bojenje na ovaj jedarni protein neurona, pri emu se u obojenim ganglionima boji samo manja populacija ganglijskih elija (od 20 do 50%).

Analiza ekspresije NF-H u ganglijskim elijama pokazala je da 91% elija ekspirira 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  $178 \pm 85,5$ .

Na osnovu analize varijanse (ANOVA) utvr eno je da postoji visoko statisti ki zna ajna razlika izme u ove etiri grupe elija po svim analiziranim obeležjima.

elije koje su izrazito ekspirirale NF-H imale su statisti ki zna ajno ve i dijametar, obim i površinu u odnosu na elije koje su umereno ekspirirale NF-H i u odnosu na elije koje su bile slabo IR.

Supstanca P bila je ekspirirana ak u 70% elija GG prisutnih na popre nom preseku gangliona, dok 30% elija nije ekspiriralo ovaj neuropeptid. Što se ti e intenziteta IHH reakcije, najve i broj obojenih elija pokazivao je slabu IR (42%), dok su umerena i izrazita IR bile prisutne u podjednakom broju obojenih elija (14%).

Ukupan prora unati skor IR za supstancu P, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog gangliona, iznosio je  $91,5 \pm 56,41$ .

Statisti ka analiza je pokazala da su ganglijske elije koje ekspiriraju SP, u proseku zna ajno manje po dijametru, obimu i površini u odnosu na ganglijske elije koje ne ekspiriraju SP.

SP+ elije pripadale su malim i srednjim ganglijskim elijama, dok su SP- elije bile distribuirane u elijama razli itim po veli inama.

CGRP se ekspimirao u 62% elija GG, dok 38% elija nije ekspimiralo ovaj neuropeptid. Što se tiče intenziteta IHH reakcije, najveći broj obojenih elija pokazivao je slabu IR (34%), umerenu imonoreaktivnost je ispoljilo (16%), a izrazitu najmanji procenat elija (12%).

Ukupan proračunati skor IR za CGRP, na osnovu semikvantitativne analize obojenih uzoraka genikulatnog ganglionona, 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 (već i prosečno) od CGRP- elija.

Poređenje malih, srednjih i velikih CGRP+ i CGRP- elija, pokazuje da nema statistički značajne razlike u distribuciji CGRP-IR. Naime, i CGRP+ i CGRP- elije klasifikovane su u sličnom procentu kao male, srednje i velike, a bilo je generalno najviše srednjevelikih elija u obe podgrupe.

Statistička obrada rezultata pokazala je da su CGRP+ elije statistički značajno veće od SP+ elija u pogledu dijametra, obima i površine.

Primenom imunohistohemijskih metoda bojenja nije pokazana ekspresija VIP-a, NPY, niti somatostatina u ganglijskim elijama *ganglionona geniculi*, dok su kontrolni uzorci pokazivali VIP-IR.

Ganglijske elije nisu ekspimirale AchE, glutamin-sintetazu kao ni tirozin-hidroksilazu na preparatima bojenim IHH metodama primenom antitela na ove enzime, odnosno elije GG ne sintetišu acetil-holin (procenjeno na osnovu izostanka bojenja na AchE), GABU (izostanak ekspresije glutamin-sintetaze), niti dopamin i noradrenalin (izostanak ekspresije tirozin-hidroksilaze).

U ganglijskim elijama GG parvalbumin se nije ekspimirao.

Transkripcioni faktor Nurr-1 ekspimirao se u ganglijskim elijama GG difuzno, u skoro svim ganglijskim elijama, a intenzitet IHH reakcije bio je snažan/umeren.

Mastociti u GG i u interganglijskim prostorima su bili uobičajena pojava u većini ispitivanih ganglionona u ovoj studiji.

## 7. LITERATURA

1. Adameyko I, Fried K. The nervous system orchestrates and integrates craniofacial development: A review. *Front Physiol.* 2016;7:49.
2. Aich A, Afrin LB, Gupta K. Mast cell-mediated mechanisms of nociception. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):29069-29092.
3. Alavian KN, Jeddi S, Naghipour SI, Nabili P, Licznernski P, Tierney TS. The lifelong maintenance of mesencephalic dopaminergic neurons by Nurr1 and engrailed. *J Biomed Sci.* 2014;21:27.
4. Álvarez Santana JM, Pérez Piñero B, Méndez A, Campos Bañales EM, López Aguado D. Morphometric study of the intrapetrous passage of the facial nerve in adult temporal bones and its application to the study of the pathogenesis of Bell facial paralysis. *An Otorrinolaringol Ibero Am.* 1991;18(1):49-60.
5. Arbusow V, Schulz P, Strupp M, Dieterich M, von Reinhardtstoettner A, Rauch E, Brandt T. Distribution of herpes simplex virus type 1 in human geniculate and vestibular ganglia: implications for vestibular neuritis. *Ann Neurol.* 1999;46(3):416-419.
6. Arif SH. A Ca(2+)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays.* 2009;31(4):410-421.
7. Ars B. Anatomy of the facial nerve. Intratemporal portion. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1986;40(1):143-148.
8. Assas B, Pennock J, Miyan JA. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Front Neurosci.* 2014; 8: Art. 23.
9. Bae JY, Kim JH, Cho YS, Mah W, Bae YC. Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol.* 2015; 523(1): 126-138.
10. Bala I, Juriši V, Laban A, Ran elovi T, Kneževi P, Pantl I. The CD34-microvascular density in colorectal cancer patients. *J BUON.* 2012; 17(1): 97-101.
11. Balkany T, Fradis M, Jafek BW, Rucker NC. Hemangioma of the facial nerve: role of the geniculate capillary plexus. *Skull Base Surg.* 1991a;1(1):59-63.

12. Balkany T, Fradis M, Javek BW. Hemangioma of the facial nerve: role of the geniculate capillary plexus. *Skull Base Surg.* 1991b; 1(1): 59-63.
13. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009;139(2):267-284.
14. Bassotti G, Antonelli E, Villanacci V, Baldoni M, Dore MP. Colonic motility in ulcerative colitis. *United European Gastroenterol J.* 2014;2(6):457-462.
15. Behrens M, Foerster S, Staehler F, Raguse JD, Meyerhof W. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* 2007; 27(46):12630-12640.
16. Bento RF, de Brito RV, Sanchez TG. A rapid and safe middle fossa approach to the geniculate ganglion and labyrinthine segment of the facial nerve. *Ear Nose Throat J.* 2002; 81(5):320-326.
17. Bigal ME, Walter S, Rapaport AM. Therapeutic antibodies against CGRP or its receptor. *Br J Clin Pharmacol.* 2015; 79(6):886-895.
18. Bignami F, Rama P, Ferrari G. Substance P and its inhibition in ocular inflammation. *Curr Drug Targets.* 2015 Oct 18. [Epub ahead of print]
19. Blunt MJ. The blood supply of the facial nerve. *J Anatomy.* 1954;88:520-526.
20. Borsay B, Skrapits K, Herczeg L, Ciofi P, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z, Hrabovszky E. Hypophysiotropic gonadotropin-releasing hormone projections are exposed to dense plexuses of kisspeptin, neurokinin B and substance p immunoreactive fibers in the human: a study on tissues from postmenopausal women. *Neuroendocrinology.* 2014;100(2-3):141-152.
21. Bradley RM. Basic neuroanatomy of the termination of the afferent input to the nucleus of the solitary tract. In: *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract. Gustatory Processing.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 1.
22. Bradley RM, King MS. Neurotransmitters and Receptors Expressed by rNST Neurons. In: *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract. Gustatory Processing.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 3.
23. Breza JM, Nikonov AA, Contreras RJ. Response latency to lingual taste stimulation distinguishes neuron types within the geniculate ganglion. *J Neurophysiol.* 2010;103(4): 1771-1784.

24. Breza JM, Contreras RJ. Acetic acid modulates spike rate and spike latency to salt in peripheral gustatory neurons of rats. *J Neurophysiol.* 2012; 108(9), 2405-2418.
25. Caicedo A, Zucchi B, Pereira E, Roper SD. Rat gustatory neurons in the geniculate ganglion express glutamate receptor subunits. *Chem Senses.* 2004;29(6):463-471.
26. Campos-Melo D, Galleguillos D, Sánchez N, Gysling K, Andrés ME. Nur transcription factors in stress and addiction. *Front Mol Neurosci.* 2013;6:44.
27. Cao MH, Ji FT, Liu L, Li F. Expression changes of parvalbumin and microtubule-associated protein 2 induced by chronic constriction injury in rat dorsal root ganglia. *Chin Med J (Engl).* 2011;124(14):2184-2190.
28. Capelle HH, Nakamura M, Lenarz T, Brandis A, Haubitz B, Krauss JK. Cavernous angioma of the geniculate ganglion. *J Neurosurg.* 2008;109(5):893-896.
29. Captier G, Canovas F, Bonnel F, Seignarbieux F. Organization and microscopic anatomy of the adult human facial nerve: anatomical and histological basis for surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005;115(6):1457-1465.
30. Carmel PW, Stein BM. Cell changes in the sensory ganglia following proximal and distal nerve section in the monkey. *J Comp Neurol.* 1969;135(2):145-165.
31. Carpenter M. *Neuroanatomy.* 4th edition; Williams & Wilkins, Baltimore, 1991.
32. Carreño M, Oña M, Melón S, Llorente JL, Díaz JJ, Suarez C. Amplification of herpes simplex virus type 1 DNA in human geniculate ganglia from formalin-fixed, nonembedded temporal bones. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;123(4):508-511.
33. Chan K-K, Lowe J. Techniques in neuropathology. In: *Theory and practice of histological techniques.* 5th Ed. Churchill Livingstone, London, 2002, pp. 271–320.
34. Chanda A, Avci E, Fossett D. Middle fossa approach. In: *Operative neurosurgical anatomy.* New York, Thieme, 2002, pp. 61-85.
35. Chaudhari N. Synaptic communication and signal processing among sensory cells in taste buds. *J Physiol.* 2014; 592(16), 3387-3392.
36. Chaudhari N, Roper SD. The cell biology of taste. *J Cell Biol.* 2010; 190(3), 285-296.
37. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature.* 2010; 464(7286), 297-301.

38. Chandrashekar J, Yarmolinsky D, von Buchholtz L, Oka Y, Sly W, Ryba NJ, Zuker CS. The taste of carbonation. *Science*. 2009; 326(595): 443–445.
39. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(5):942-946.
40. Chopra R, Fergie N, Mehta D, Liew L. The middle cranial fossa approach: an anatomical study. *Surg Radiol Anat* 2003;24(6):348-351, Discussion 252-253.
41. Cimino T, Giacobbi D. A case of the Ramsay-Hunt syndrome (herpes zoster of the geniculate ganglion) with concomitant C2 and C3 nerve involvement. *Minerva Med*. 1978; 69(35):2391-2394.
42. Clark AA; Liggett SB, Munger SD. Extraoral bitter taste receptors as mediators of off-target drug effects. *FASEB J*. 2012; 26(12): 4827-4831.
43. Clarke JA. An X-ray microscopic study of the arterial supply to the facial nerve. *J Laryngol Otol*. 1965;79(11): 987-994.
44. Corrigan F, Vink R, Turner RJ. Inflammation in acute CNS injury: a focus on the role of substance P. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):703-715.
45. Crosby EC, Humphrey T, Lauwe EW. *Correlative Anatomy of the Nervous System*. Macmillan, New York, 1962.
46. De Ariba Lassaletta L, Pérez-Mora RM, Gavilán J. A new entity in the differential diagnosis of geniculate ganglion tumours: Fibrous connective tissues lesion of the facial nerve. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2013;64(3):240-242.
47. Decressac M, Volakakis N, Björklund A, Perlmann T. NURR1 in Parkinson disease—from pathogenesis to therapeutic potential. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(11):629-636.
48. Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12(3):139-153.
49. DeSimone JA, Lyall V. Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract III. Salty and sour taste: Sensing of sodium and protons by the tongue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 291(6):G1005-G1010.
50. Dinnella C, Recchia A, Vincenzi S, Tuorila H, Monteleone E. Temporary modification of salivary protein profile and individual responses to repeated phenolic astringent stimuli. *Chem. Senses*. 2010, 35(1):75-85.



51. Ding L, Song T, Yi C, Huang Y, Yu W, Ling L, Dai Y, Wei Z. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) improves the diabetic cytopathy (DCP) via up-regulation of CGRP and cAMP. *PLoS One*. 2013; 8:e57477.
52. Dobozi M. Surgical anatomy of the geniculate ganglion. *Acta Otolaryngol*. 1975;80(1-2):116-119.
53. Dozic A, Cetkovic M, Marinkovic S, Mitrovic D, Grujicic M, Micovic M, Milosavljevic M. Vascularisation of geniculate ganglion. *Folia Morphol (Warch)*. 2014;73(4):414-421.
54. Dudek RW. *BRS Embriology*, sixth ed, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2014.
55. El-Khouly H, Fernandez-Miranda J, Rhoton AL Jr. Blood supply of the facial nerve in the middle fossa: the petrosal artery. *Neurosurgery*. 2008;62(5 Suppl 2):297-303; discussion ONS303-ONS304.
56. Falcioni M, Piccirillo E, Taibah A, Sanna M. Meningiomas intrinsic to the geniculate ganglion. *Skull Base*. 2001;11(4):297-2302.
57. Farbman AI. Fine structure of the taste bud. *J Ultrastruct Res*. 1965; 12, 328-350.
58. Farbman AI, Guagliardo N, Sollars SI, Hill DL. Each sensory nerve arising from the geniculate ganglion expresses a unique fingerprint of neurotrophin and neurotrophin receptor genes. *J Neurosci Res*. 2004;78(5):659-667.
59. Fehér E. Changes in neuropeptide Y and substance P immunoreactive nerve fibres and immunocompetent cells in hepatitis. *Orv Hetil*. 2015;156(47):1892-1897.
60. Fei D, Krimm R. Taste neurons consist of both a large TrkB-receptor-dependent and a small TrkB-receptor-independent subpopulation. *PLOS ONE*; 2013; 8(12): e83460.
61. Fitzgerald TMJ, Gruener G, Mtui E. *Clinical Neuroanatomy and Neuroscience*, 6th ed., Saunders/Elsevier, Edinburgh, UK, 2012.
62. Foley JO, Pepper Hr, Kessler WH. The ratio of nerve fibers to nerve cells in the geniculate ganglion. *J Comp Neurol*. 1946;85:141-148.
63. Fontaine-Perus J, Chanconie M, Le Douarin NM. Embryonic origin of substance P containing neurons in cranial and spinal sensory ganglia of the avian embryo. *Dev Biol*. 1985;107(1):227-238.
64. Fox AL. The relationship between chemical constitution and taste. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1932; 18(1):115-126.

65. Furuta Y, Takasu T, Fukuda S, Sato-Matsumura KC, Inuyama Y, Hondo R, Nagashima K. Detection of varicella-zoster virus DNA in human geniculate ganglia by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1992a;166(5):1157-1159.
66. Furuta Y, Takasu T, Sato KC, Fukuda S, Inuyama Y, Nagashima K. Latent herpes simplex virus type 1 in human geniculate ganglia. *Acta Neuropathol.* 1992b;84(1):39-44.
67. Gacek RR. On the duality of the facial nerve ganglion. *Laryngoscope.* 1998;108(7):177-186.
68. García Almagro D, García Pérez M. Ramsay Hunt syndrome (region of the geniculate ganglion). Dissemination caused by corticoids and treated with griseofulvin. *Actas Dermosifiliogr.* 1977; 68(11-12):643-650.
69. Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and pharmacological aspects of the NK1-receptor. *Biomed Res Int.* 2015;2015:495704.
70. Garcin M, Pech-Gourg F. Current data concerning the geniculate ganglion (author's transl)]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1978;95(1-2):57-72.
71. Gasser RF. The development of the facial nerve in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1967; 76(1): 37-56.
72. Gasser RF. The early development of the parotid gland around the facial nerve and its branches in man. *Anat Rec.* 1970;167(1): 63-78.
73. Gasser RF, May M. Embryonic development of the facial nerve. In *Facial nerve.* Thieme Inc, New York, 1985, pp. 3-20.
74. Ge XX, Spector GJ. Labyrinthine segment and geniculate ganglion of facial nerve in fetal nerve in fetal and adult human temporal bones. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1981; 90(4 Pt 2):1-12.
75. Ge X. Decompression of geniculate ganglion of facial nerve. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 1990;25(3):142-4, 189-90.
76. Gellis SS, Feingold M, Black DC. Geniculate ganglion syndrome (Hunt's syndrome, Herpes zoster oticus). *Am J Dis Child.* 1968;115(2):279-280.
77. Gilden D. Functional anatomy of the facial nerve revealed by Ramsay Hunt syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2013; 80(2): 78-79.
78. Gobel S. Sinaptic organization of the substantia gelatinosa glomeruli in the spinal trigeminal nucleus of the adult cat. *J Neurocytol.* 1974; 3 (2):219-243.

79. González García JA, Arenas Brítez O, Gil Carrasco R, Lendoiro Otero C, Rodríguez Paramás A, Scola Yurrita B. Genuiculate ganglion tumors. Therapeutic and reconstructive management. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004;55(5): 206-211.
80. Granstein RD, Wagner JA, Stohl LL, Ding W. Calcitonin gene-related peptide: key regulator of cutaneous immunity. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015; 213(3): 586-594.
81. Grässel S. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Mol Pain*. 2014;10:69.
82. Grey H. *Anatomy of the Human Body*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; 20th ed., thoroughly rev. and re-edited by Warren H. Lewis, Bartleby.com, 2000.
83. Grose C, Bonthius D, Afifi AK. Chickenpox and the genuiculate ganglion: facial nerve palsy, Ramsay Hunt syndrome and acyclovir treatment. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(7): 615-617.
84. Hahn U, Duffner F, Küker W. Schwannoma of the genuiculate ganglion. *Rofo*. 2003; 175(2): 287-288.
85. Hall GM, Pulec JL, Rhoton AL. Genuiculate ganglion anatomy for the otologist. *Arch Otolaryngol*. 1969;90(5):568-571.
86. Hardebo JE, Suzuki N, Ekman R. Presence of gastrin-releasing peptide in neurons of the genuiculate ganglion in rat and man. *Neurosci Lett*. 1992;139(2):239-42.
87. Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(6): 555-576.
88. Hashemilar M, Ghabili K, Shoja MM, Savadi-Oskouei D, Keyvani H. Varicella-zoster virus reactivation from multiple ganglia: a case report. *J Med Case Rep*. 2009;3:9134.
89. He Y, Ding G, Wang X, Zhu T, Fan S. Calcitonin gene-related peptide in Langerhans cells in psoriatic plaque lesions. *Chin Med J (Engl)*. 2000; 113(8):747-751.
90. Helms J. Trauma of the facial nerve at the genuiculate ganglion (author's transl). *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1979;58(2):144-148.
91. Hino N, Masuko S, Katsuki T. An immunohistochemical study of sensory and autonomic innervation of the dog tongue with special reference to substance P-and calcitonin gene-related peptide-containing fibers in blood vessels and the intralingual ganglia. *Arch Histol Cytol*. 1993; 56(5):505-516.
92. Holland J, Bernstein J. Bell's palsy. *BMJ Clin Evid*. 2011;2011. pii: 1204.

93. Hoshino N, Vatterott P, Egwiekhor A, Rochlin MW. Brain-derived neurotrophic factor attracts geniculate ganglion neurites during embryonic targeting. *Dev Neurosci*. 2010; 32(3):184-196.
94. Hou Q, Barr T, Gee L, Vickers J, Wymer J, Borsani E, Rodella L, Getsios S, Burdo T, Eisenberg E, Guha U, Lavker R, Kessler J, Chittur S, Fiorino D, Rice F, Albrecht P. Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide beta: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *Pain*. 2011;152(9):2036-2051.
95. Hrabovszky E, Borsay BÁ, Rácz K, Herczeg L, Ciofi P, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z. Substance P immunoreactivity exhibits frequent colocalization with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. *PLoS One*. 2013;19; 8(8): e72369.
96. Hu ZL, Masuko S, Katsuki T. Distribution and origins of nitric oxide-producing nerve fibers in the dog tongue: correlated NADPH-diaphorase histochemistry and immunohistochemistry for calcitonin gene-related peptide using light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 1996; 59(5):491-503.
97. Huang T, Krimm RF. Developmental expression of Bdnf, Ntf4/5, and TrkB in the mouse peripheral taste system. *Dev Dyn*. 2010;239(10):2637-2646.
98. Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*. 2006;442(7105):934-938.
99. Huque T, Cowart BJ, Dankulich-Nagrudny L, Pribitkin EA, Bayley DL, Spielman AI, Feldman RS, Mackler SA, Brand JG. Sour ageusia in two individuals implicates ion channels of the ASIC and PKD families in human sour taste perception at the anterior tongue. *PLoS One* 2009;4(10), e7347.
100. Ichiyama M, Itoh M, Miki T, Xie Q, Kaneto T, Takeuchi Y. Central distribution of sensory fibers in the facial nerve: an anatomical and immunohistochemical study. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1997;74(1):53-63.
101. Ikeda, K. New seasonings (in Japanese). *J Tokyo Chem Soc*. 1909;30(3):820-836.
102. Isaacson B, Vrabec JT. The radiographic prevalence of geniculate ganglion dehiscence in normal and congenitally thin temporal bones. *Otol Neurotol* 2007;28(1):107-110.

103. Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103(33):12569-12574.
104. Iwatsuki K, Uneyama H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci.* 2012; 118(2):123-128.
105. Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2005;77(1-2):128-138.
106. Kalani Y, Iyer S, Gunawardena M P, .Syms M, Porter R. Transcochlear approach to a geniculate ganglion hemangioma and reanastomosis of facial nerve. *Cureus.* 2014; 6(11): e223.
107. Katsura H, Tsuzuki K, Noguchi K, Sakagami M. Differential expression of capsaicin-, menthol-, and mustard oil-sensitive receptors in naive rat geniculate ganglion neurons. *Chem Senses.* 2006;31(7):681-688.
108. Kestell GR, Anderson RL, Clarke JN, Haberberger RV, Hibbins IL. Primary afferent neurons containing calcitonin gene-related peptide but not substance P in forepaw skin, dorsal root ganglia, and spinal cord of mice. *J Comp Neurol.* 2015;523(17):2555-2569.
109. Kim IS, Shin SH, Kim J, Lee WS, Lee HK. Correlation between MRI and operative findings in Bell's palsy and Ramsay Hunt syndrome. *Yonsei Med J.* 2007;48(6):963-968.
110. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Rbfox3, a member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *J Biol Chem* 2009; 284(45): 31052-31061.
111. King MS. Anatomy of the rostral nucleus of the solitary tract. In: *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract. Gustatory Processing.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 2.
112. King MS, Bradley RM. Biophysical properties and responses to glutamate receptor agonists of identified subpopulations of rat geniculate ganglion neurons. *Brain Res.* 2000; 866(1-2):237-246.
113. Kitamura K, Kimura RS, Schuknecht HF. The ultrastructure of the geniculate ganglion. *Acta Otolaryngol.* 1982;93(1-6):175-186.
114. Kleij HP, Bienenstock J. Significance of conversation between mast cells and nerves. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2005;1(2):65-80.

115. Koga T, Bradley RM. Biophysical properties and responses to neurotransmitters of petrosal and geniculate ganglion neurons innervating the tongue. *J Neurophysiol.* 2000;84(3):1404-1413.
116. Kokrashvili Z, Yee KK, Ilegems E, Iwatsuki K, Li Y, Mosinger B, Margolskee RF. Endocrine taste cells. *Br J Nutr.* 2014;111(0 1): S23-S29.
117. Kovács KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR. C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurones. *J Neurochem.* 2006;98(5):1390-399.
118. Krimm RF. Mice lacking the p75 receptor fail to acquire a normal complement of taste buds and geniculate ganglion neurons by adulthood. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006;288(12):1294-1302.
119. Krimm RF. Factors that regulate embryonic gustatory development. *BMC Neurosci.* 2007; 8 (Suppl 3):S4.
120. Krimm RF, Miller KK, Kitzman PH, Davis BM, Albers KM. Epithelial overexpression of BDNF or NT4 disrupts targeting of taste neurons that innervate the anterior tongue. *Dev Biol.* 2001;232(2):508-521.
121. Kuhn C; Bufe B; Batram C, Meyerhof W. Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 2010, 35(5): 395-406.
122. Kukumberg P, Karlík M, Be ová-Liszeková D, Be o M, Pechan T, Farkaš R. New perspectives in human tear analysis? *Neuroendocrinol Lett* 2015;36(3):185-186.
123. Lan MY, Shiao JY. Using greater superficial petrosal nerve and geniculate ganglion as the only two landmarks for indentifying internal auditory canal in meddle fossa approach. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010; 267(12):1867-1871.
124. Lang J. Neuroanatomy of the optic, trigeminal, facial, glossopharyngeal, vagus, accessory and hypoglossal nerves (author's transl). *Arch Otorhinolaryngol.* 1981;231(1):1-69.
125. Lee HK, Kim IS, Lee WS. New method of identifying the internal auditory canal as seen from the middle cranial fossa approach. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(6):457-460.
126. Lerner UH, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008; 8(2):154-165.

127. Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*. 2007;130(1-2): 166-176.
128. Li F. Taste perception: From the tongue to the testis. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(6):349–360.
129. Li Q, Peng J. Sensory nerves and pancreatitis. *Gland Surg*. 2014;3(4):284-292.
130. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002; 99(7):4692-4696.
131. Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA. Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol*. 2004; 92(5):2909-2919.
132. Lindemann B, Ogiwara Y, Ninomiya Y. The discovery of umami. *Chem Senses*. 2002; 27(9):843-844.
133. Linscheid P, Seboek D, Schaer DJ, Zulewski H, Keller U, Muller B. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med* 2004; 32(8):1715-1721.
134. Liu J, Li Y, Yuan X, Lin Z. Bell's palsy may have relations to bacterial infection. *Med Hypotheses*. 2009;72(2):169-170.
135. Liubimov NN, Bobkova RM. Afferent connections of the geniculate ganglion of the facial nerve. *Zh Nevropatol Psikiatr Im S S Korsakova*. 1966;66(3):402-408.
136. Lotts T, Ständer S. Research in practice: substance P antagonism in chronic pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014;12(7):557-559.
137. Lundy RF Jr, Contreras RJ. Gustatory neuron types in rat geniculate ganglion. *J Neurophysiol*. 1999;82(6):2970-2988.
138. Luo Y. The function and mechanisms of Nurr1 action in midbrain dopaminergic neurons, from development and maintenance to survival. *Int Rev Neurobiol*. 2012;102:1-22.
139. Lv X, Wu Z, Li Y. Innervation of the cerebral dura mater. *Neuroradiol J*. 2014;27(3):293-298.
140. Ma Q. Itch modulation by VGLUT2-dependent glutamate release from somatic sensory neurons. In: *Itch: Mechanisms and Treatment*, edited by Carstens E, Akiyama T. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014. Chapter 21.

141. Ma QP, Hill R, Sirinathsinghji D. Colocalization of CGRP with 5-HT1B/1D receptors and substance P in trigeminal ganglion neurons in rats. *Eur J Neurosci.* 2001;13(11):2099-20104.
142. Maeda N, Ohmoto M, Yamamoto K, Kurokawa A, Narukawa M, Ishumaru Y, Misaka T, Matsumoto I, Abe K. Expression of serotonin receptor genes in cranial ganglia. *Neurosci Lett.* 2016;617:46-51.
143. Magliulo G, Alla FR, Colicchio G, Trasimeni G. Genuiculate ganglion meningioma. *Skull Base.* 2010; 20(3):185-188.
144. Magnussen C, Hung SP, Ribeiro-da-Silva A. Novel expression pattern of neuropeptide Y immunoreactivity in the peripheral nervous system in a rat model of neuropathic pain. *Mol Pain.* 2015;11:31.
145. Mangold JE, Hill DL. Extensive reorganization of primary afferent projections into the gustatory brainstem induced by feeding a sodium-restricted diet during development: less is more. *J Neurosci.* 2007;27(17):4650-4662.
146. Marinkovi S, etkovi M, Gibo H, Todorovi V, Jan i J, Milisavljevi M. Immunohistochemistry of the displaced neurons in the trigeminal nerve root. *Cells Tissues Organs* 2010; 191(4):326-335.
147. Masliukov PM, Porseva VV, Korzina MV, Nozdrachev AD. Neurochemical properties of sensory neurons in the development. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2013;99(7):777-792.
148. Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, Nakano T, Kitamura Y. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol.* 1989; 142(3): 927-931.
149. Matsumoto I, Emori Y, Ninomiya Y, Abe K. A comparative study of three cranial sensory ganglia projecting into the oral cavity: *in situ* hybridization analyses of neurotrophin receptors and thermosensitive cation channels. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;93(2):105-112.
150. McCoy ES, Zylka MJ. Enhanced behavioral responses to cold stimuli following CGRP sensory neuron ablation are dependent on TRPM8. *Molecular Pain.* 2014, 10:69.
151. McMorrow JP, Murphy EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):688-693.



152. Messlinger K, Fischer MJM, Lennerz JK. Neuropeptide effects in the trigeminal system: Pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J Med.* 2011; 60(3):82-89.
153. Miller RS, Pensak ML. The superior petrosal triangle as a constant anatomical landmark for subtemporal middle fossa orientation. *Laryngoscope* 2003;113(8):1327-1231.
154. Minatogawa T, Kumoi T, Hosomi H, Kokan T. The blood supply of the facial nerve in the human temporal bone. *Auris Nasus Larynx.* 1980;7(1):7-18.
155. Mistrova E, Kruzliak P, Chottova Dvorakova M. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides.* 2015; pii: S0143-4179(15)00225-5.
156. Miyamoto T, Fujiyama R, Okada Y, Sato T. Sour transduction involves activation of NPPB-sensitive conductance in mouse taste cells. *J. Neurophysiol.* 1998; 80(4):1852-1859.
157. Molander C, Ygge J, Dalsgard CJ. Substance P-, somatostatin- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity and fluoride resistant acid phosphatase-activity in relation to retrograde labeled cutaneous, muscular and visceral primary sensory neurons in the rat. *Neurosci Lett.* 1987;74(1):37-42.
158. Mom T, Gabrillargues J, Gilain L, Chazal J, Kemeny JL, Vanneuville G. Anatomy of the vestibulo-acoustico-facial neurovascular pedicle. Importance of therapeutic management of vestibular schwannomas. *Neurochirurgie.* 2002;48(5): 387-397.
159. Monkhouse WS. The anatomy of the facial nerve. *Ear Nose Throat J.* 1990;69(10):677-783, discussion 686-687.
160. Morre KL, Persaud TVN. *The Developing Human*, 8<sup>th</sup> edition; Saunders-Elsevier, Philadelphia, 2008.
161. Moriyama H, Shimada K, Goto N, Shigihara S, Gasser RF. Observations on the geniculate ganglion in adult human dissections. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1994:S117-119.
162. Moriyama H, Shimada K, Goto N. Morphometric analysis of neurons in ganglia: geniculate, submandibular, cervical spinal and superior cervical. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1995; 72(4):185-190.
163. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in the vertebrates. *Development (Cambridge, England)* 1992;116(1): 201-211.
164. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids.* 2014;46(7):1727-1750.

165. Muñoz M, Coveñas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci.* 2015;40(2):441-463.
166. Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y. Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol.* 2010, 104(2):896-901.
167. Nakamura S, Bradley RM. Characteristics of sodium currents in rat geniculate ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2011;106(6):2982-2991.
168. Nawar NNY. Study on the fibre arrangement of the dorsal nerve root and its cellular constituents in the mouse fetus. *Acta Anat.* 1976; 95(1):116-121.
169. Nawar NN, Mikhail Y, Ibrahim KA. Quantitative and histomorphological studies on the geniculate ganglion of the facial nerve in man. *Acta Anat (Basel).* 1980;106(1):57-62.
170. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. An amino-acid taste receptor. *Nature.* 2002; 416(6877):199-202.
171. Niki M, Yoshida R, Takai S, Ninomiya Y. Gustatory signaling in the periphery: Detection, transmission and modulation of taste information. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(1),1772–1777.
172. Nishida K, Yamasaki S, Ito Y, Kabu K, Hattori K, Tezuka T, Nishizumi H, Kitamura D, Goitsuka R, Geha RS, Yamamoto T, Yagi T, Hirano T. Fc (epsilon) RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2005;170(1):115-126.
173. Nomura S, Mizuno N. Central distribution of afferent and efferent components of the chorda tympani in the cat as revealed by the horseradish peroxidase method. *Brain Res.* 1981;214(2):229-237.
174. Onaga T. Tachykinin: recent developments and novel roles in health and disease. *Biomol Concepts.* 2014;5(3):225-243.
175. Panula P, Hadjiconstantinou M, Yang HY, Costa E. Immunohistochemical localization of bombesin/gastrin-releasing peptide and substance P in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 1983;3(10): 2021-2029.
176. Park SK, Lee DS, Bae JY, Bae YC. Central connectivity of the chorda tympani afferent terminals in the rat rostral nucleus of the solitary tract. *Brain Struct Funct.* 2016;221(2): 1125-1137.

177. Patel AA. Facial nerve anatomy, 2015. <http://emedicine.medscape.com/article/835286>.
178. Patel AV, Huang T, Krimm RF. Lingual and palatal gustatory afferents each depend on both BDNF and NT-4, but the dependence is greater for lingual than palatal afferents. *J Comp Neurol*. 2010;518(16):3290-3301.
179. Patel AV, Krimm RF. BDNF is required for the survival of differentiated geniculate ganglion neurons. *Dev Biol*. 2010;340(2):419-429.
180. Patel AV, Krimm RF. Neurotrophin-4 regulates the survival of gustatory neurons earlier in development using a different mechanism than brain-derived. *Dev Biol*. 2012;365(1):50-60.
181. Pavel J, Hricová L, Jergová S, Lukášová N. The impact of short-lasting repeated vibrations on retrograde axonal transport, the expression of CGRP and parvalbumin in lower lumbar dorsal root ganglia. *Brain Res*. 2011;1396:1-10.
182. Pearen MA, Muscat GE. Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol*. 2010;24(10):1891-1903.
183. Perlmann T, Wallén-Mackenzie A. Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):45-52.
184. Petanjek Z, Milić V. Funkcionalna organizacija moždanih živaca. *Medicinar*. 1997:27-32.
185. Peters GA. The presence of sensory cells in the central root of trigeminal nerve. *J Comp Neurol*. 1935; 62(2):349-360.
186. Pop E, Mardarescu M, Lazar L, Rusu MC, Ion DA. C-Kit expression in somatosensory nuclei of lower medulla oblongata. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(3 Suool):721-724.
187. Ranhotra HS. The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015;35(2):184-188.
188. Roper SD. Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Semin Cell Dev Biol*. 2013; 24(1):71-79.
189. Ross OB Jr. Geniculate ganglion pain. *N C Med J*. 1949;10(3):114-117.
190. Runge HM, Hoshino H, Biehl MJ, Ton S, Rochlin MW. NT4 is more potent than BDNF in promoting, attracting, and suppressing geniculate ganglion neurite outgrowth. *Dev Neurosci*. 2012; 34(5):389-401.
191. Rupa V, Weider DJ, Glasner S, Saunders RL. Geniculate ganglion: anatomic study with surgical implications. *Am J Otol*. 1992;13(5):470-473.

192. Russel FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014; 94(4):1099-1142.
193. Russo AF. Calcitonin gene-related peptide: a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015; 55: 533–552.
194. Sachin G, Mends F, Hagiwara M, Fatterpekar G, Roehm PC. Imaging of the facial nerve: A contemporary review. *Radiol Res Prac.* 2013;2013:248039.
195. Sandelin M, Zabihi S, Liu L, Wicher G, Kozlova EN. Metastasis-associated S100A4 (Mts1) protein is expressed in subpopulations of sensory and autonomic neurons and in Schwann cells of the adult rat. *J Comp Neurol.* 2004;473(2):233-243.
196. Sandweiss AJ, Vanderah TW. The pharmacology of neurokinin receptors in addiction: prospects for therapy. *Subst Abuse Rehabil.* 2015;6:93-102.
197. Safe S, Jin UH, Hedrick E, Reeder A, Lee SO. Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets. *Mol Endocrinol.* 2014;28(2):157-172.
198. Sato D, Sato T, Urata Y, Okajima T, Kawamura S, Kurita M, Takahashi K, Nanno M, Watahiki A, Kokubun S, Shimizu Y, Kasahara E, Shoji N, Sasano T, Ichikawa H. Distribution of TRPVs, P2X3, and parvalbumin in the human nodose ganglion. *Cell Mol Neurobiol.* 2014; 34(6):851-858.
199. Satomi H, Takahashi K. The distribution and significance of aberrant ganglion cells in the facial nerve trunk of the cat. *Anat Anz.* 1986;162(1):41-46.
200. Scrapits K, Borsay B, Herczeg L, Ciofi P, Liposits Z, Hrabovszky E. Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Front Neurosci.* 2015;9:29.
201. Seta Y, Toyoshima K. Three-dimensional structure of the gustatory cell in the mouse fungiform taste buds: A computer-assisted reconstruction from serial ultrathin sections. *Anat Embryol.* 1995;191(2), 83-88.
202. Shi TJ, Xiang Q, Zhang MD, Tortoriello G, Hammarberg H, Mulder J, Fried K, Wagner L, Josephson A, Uhlén M, Harkany T, Hökfelt T. Secretagoin is expressed in sensory CGRP neurons and in spinal cord of mouse and complements other calcium-binding proteins, with a note on rat and human. *Mol Pain.* 2012;8:80.
203. Shimozawa A. Quantitative studies on the mouse facial nerve trunk distal to the geniculate ganglion. An electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel).* 1976;95(4):529-536.

204. Shimozawa A. Electron-microscopic analysis of the mouse facial nerve near the geniculate ganglion. *Acta Anat (Basel)*. 1978;100(2):185-192.
205. Shin Y-K, Martin B, Kim W, White CM, Ji S, Sun Y, Smith RG, Sévigny J, Tschöp MH, Maudsley S, Egan JM. Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS One* 2010; 5(9):e12729.
206. Sillman JS, Levine RA, Kobler JB. Laser doppler measurements of intratemporal facial nerve blood flow. *Am J Otol*. 1994;15(3):327-334.
207. Silverman JD, Kruger L. Calcitonin-gene-related-peptide-immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures. *J Comp Neurol*. 1989;280(2): 303-330.
208. Smidt MP, Burbach JP. Terminal differentiation of mesodiencephalic dopaminergic neurons: the role of *Nurr1* and *Pitx3*. *Adv Exp Med Biol*. 2009;651:47-57.
209. Spasova I. Fine structure of the neurons of the geniculate ganglion of the cat. *J Hirnforsch*. 1983;24(1):123-133.
210. Standring S. Head and neck. In: *Anatomy. The anatomical basis of clinical practice*. 14th Ed. Churchill Livingstone, Elsevier, London, 2008, pp. 395-703.
211. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev*. 2014;94(1):265-301.
212. Streeter GL. On the development of the membranous labyrinth and the acoustic and facial nerves in the human embryo. *Am J Anat*. 1906;6:139-165.
213. Sun L, Coy DH. Somatostatin and its Analog. *Curr Drug Targets*. 2016;17(5):529-537.
214. Suzuki T. Cellular mechanisms in taste buds. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2007;48(4):151-161.
215. Sweeney CJ, Gilden DH. Ramsay Hunt syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71(2):149-154.
216. Tajti J, Szok D, Majláth Z, Tuka B, Csáti A, Vécsei L. Migraine and neuropeptides. *Neuropeptides*. 2015;52:19-30.
217. Takeda T, Takeda S, Kozakura K, Saito H. Intratemporal facial nerve blood flow in guinea pigs. *Am J Otol*. 1997; 18(2):252-256.

218. Thompson-Turner M, Nayak S, Kuhn M, Roehm PC. The effects of dexametasone and acyclovir on a cell culture on delayed facial palsy. *Otol Neurotol*. 2014; 35(4):712-718.
219. Todd NW. Helpful and unhelpful parts of the superior petrosal triangle. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(6):966-969.
220. Todd NW. Cochlear implantation via the middle fossa: surgical and electrode array considerations. *Cochlear Implants Int*. 2007;8(1):12-28.
221. Todorovi V, Jani B, Koko V, Micev M, Nikoli JA, Ratkovi M, Lepasavi G, Jankovi T, Kneževi -Ušaj S, Mili evi Z. Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis – immunohistochemical and radioimmunoassay study. *HepatoGastroenterology* 1996;43(9):483-488.
222. Toulgoat F, Sarrazin JL, Benoudiba F, Pereon Y, Auffray-Calvier E, Daumas-Duport B, Lintia-Gaulter A, Desel HA. Facial nerve: From anatomy to pathology. *Diag Intervent Imag*. 2013; 94(10):1030-1042.
223. Tsuzuki K, Noguchi K, Mohri D, Yasuno H, Umemoto M, Shimobayashi C, Fukazawa K, Sakagami M. Expression of activating transcription factor 3 and growth-associated protein 43 in the rat geniculate ganglion neurons after chorda tympani injury. *Acta Otolaryngol*. 2002; 122(2):161-167.
224. Tubbs SR, Steck DT, Mortazavi MM, Cohen-Gadol AA. The nervus intermedius: a review of its anatomy, function, pathology, and role. *World Neurosurg*. 2013;79(5-6):763-767.
225. Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, Ishida Y, Inagaki A, Nishigaki M, Shimada S. Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci*. 2003;23(9):3616-3622.
226. Ulug T, Ozturk A, Sahinoglu K. A multipurpose landmark for skull-base surgery: Henle's spine. *J Laryngol Otol*. 2005a;119(11):856-861.
227. Ulug T, Ulubil SA. Management of facial paralysis in temporal bone fractures: a prospective study analyzing 11 operated fractures. *Am J Otolaryngol* 2005b;26(4):230-238.
228. Ulug T, Ulubil SA. Contralateral labyrinthine concussion in temporal bone fractures. *J Otolaryngol* 2006;35(6):380-383.
229. Ulug T. Using the processus cochleariformis as a multipurpose landmark in middle cranial fossa surgery. *J Laryngol Otol*. 2009;123(2):163-169.
230. Van Buskirk C. The seventh nerve complex. *J Comp Neurol*. 1945; 83:303-333.

231. Van Heertum RL, Tikofsky RS, Ichise M. Functional cerebral SPECT and PET imaging. 4th Ed. Wolters Kluwer, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010.
232. Veillon F, Taboada LR, Eid MA, Riehm S, Debry C, Schultz P, Charpiot A. Pathology of the facial nerve. *Neuroimaging Clin N Am*. 2008;18(2):309-320.
233. Vrabec JT, Alford RL. Quantitative analysis of herpes simplex virus in cranial nerve ganglia. *J Neurovirol*. 2004;10(4):216-222.
234. Walter S, Bigal ME. TEV-48125: a review of a monoclonal CGRP antibody in development for the preventive treatment of migraine. *Curr Pain Headache Rep*. 2015; 19(3):6.
235. Wegłowski M, Wo niak W, Piotrowski A, Bruska M, Wegłowska J, Soba ski J, Grzymisławska M, Łupicka J. Early development of the facial nerve in human embryos at stages 13-15. *Folia Morphol*. 2015; 74(2): 252-257.
236. Weinstock JV. Substance P and the regulation of inflammation in infections and inflammatory bowel disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(2):453-461.
237. Whittaker VP. Some currently neglected aspects of cholinergic function. *Mol Neurosci*. 2010; 40(1-2):7-11.
238. Williams PL, Warwick R. *Gray's Anatomy*, 36th ed.; Churchill and Livingstone: Edinburgh, Scotland; London, UK; Melbourne, Australia; New York, NY, USA, 1980; pp. 1054-1086,
239. Wo niak W, Bruska M, Ulatowska-Błaszyk K, Skórzewska A. The vestibulocochlear ganglion in human embryos at stage 13. *Folia Morphol*. 1993; 52(2): 92-107.
240. Wu A, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaundhari N, Roper SD. Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nat Commun*. 2015; 16(6):8171.
241. Yallampalli C, Chauhan M, Satsishkumar K. Calcitonin gene-related family peptides in vascular adaptations, uteroplacental circulation, and fetal growth. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(5):641-54.
242. Yamazaki K, Sato H, Murai K, Ogawa K. Infantile congenital petrosal cholesteatoma: a case report and literature review. *Int J Pediatr Otorinolaryngol*. 2005; 69(12):1703-1707.
243. Yasuo T, Kusuhara Y, Yasumatsu K, Ninomiya Y. Multiple receptor systems for glutamate detection in the taste organ. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(10):1833-1837.

244. Yilmaz F, Gurel K, Gurel Sm Sessiz N, Boran C. Genuculo-temporo-parotideal neurofibroma of the facial nerve. A case report. *Neuroradiol J.* 2007; 19(6):792-797.
245. Yoshida R, Ninomiya Y. New insights into the signal transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2010; 279:101-134.
246. Jyotaki M, Shigemura N, Ninomiya Y. Modulation of sweet taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors. *Endocr J.* 2010; 57(6):467-475.
247. Zaidi FN, Todd K, Enquist L, Whitehead MC. Types of taste circuits synaptically linked to a few geniculate ganglion neurons. *J Comp Neurol.* 2008;511(6):753-772.
248. Zhang MD, Tortoriello G, Hsueh B, Tomer R, Ye L, Mitsios N, Borgius L, Grant G, Kiehn O, Watanabe M, Uhlén M, Mulder J, Deisseroth K, Harkany T, Hökfelt TG. Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(12):E1149-58.
249. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(8):1535-1541.
250. Zou Y, Huang Y, Wang J. Morphologic characteristic of substance P immunoreactivity in facial nerve of normal cats. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 1995;30(2):78-79.



## **SPISAK SKRA ENICA**

**Ach** - acetil- holin

**AchE** - acetil holin - esteraza

**ACI** - arteria carotis interna

**AMM** - arteria meningea media

**AP** - arteria petrosa

**BDNF** - moždani neurotrofi ni faktor

**CapStap** - caput stapedis

**CGRP** - peptid kodiran genom za kalcitonin

**DOPA** - dopamin

**EmPyr** - eminentia pyramidalis

**ForAP** - foramen arteriae petrosae

**FS** - foramen stylomastoideum

**GABA** - gama-amino buterna kiselina

**GDNF** - glijalni neurotrofi ni faktor

**GG** - ganglion geniculi

**H&E** - hematoksilin-eozin

**IB4** - isoelection B4

**IHH** - imunohistohemija

**NCAM** - neuralni celularni adhezivni molekul

**NeuN** - DNK-vezuju i protein nukleusa neurona

**NF-H** - neurofilamentni protein velike molekulske težine

**NMB** - neuromendin B

**NPM** - nervus petrosus major

**NPY** - neuropeptid Y

**NSE** - neuron specifi na enolaza

**NTS** - nucleus tractus solitarii

**5HT** - serotonin

**PGP9.5** - proteinski genski produkt 9.5

**ProcCoch** - processus cochleariformis

**Prom** - promontorium

**So** - somatostatin

**SP** - supstanca P

**Sy** - sinaptofizin

**VIIbis** - nervus intermedius

**VIICN** - nervus facialis

**VIP** - vazoaktivni intestinalni peptid

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Aleksandra Dožić rođena je 21. 09. 1966. u Podgorici gde je završila osnovnu i srednju školu. Stomatološki fakultet u Beogradu upisala je 1985. godine. Od 1988. do 1991. godine bila je demonstrator na nastavnom predmetu – Patologija. Diplomirala je 1991. godine sa prosečnom ocenom 9,42, kao najbolji diplomirani student koji je diplomirao na Stomatološkom fakultetu te godine.

Poslediplomske studije upisala je 1993. godine na Stomatološkom fakultetu i magistarski rad "Morfološka istraživanja senzitivnih jedara trigeminusa oveka" odbranila je 9. juna 1998. godine pred komisijom u sastavu: prof. dr Slobodan Malobabić, predsednik, prof. dr Goran Vujašković i Prof. Dr Milica Skender-Gazibara.

Specijalistički ispit iz oblasti "Ortopedija vilica" položila je 26. 04. 2001. sa odličnom ocenom. Kao asistent pripravnik za naučnu oblast Anatomija Stomatološkog fakulteta u Beogradu primljena je 31. 11. 1994. godine. U zvanje asistenta, u kojem je i danas, izabrana je 1. 12. 1998. godine.

Decembra 2012. godine, na Medicinskom fakultetu u Beogradu, prijavljuje temu za izradu doktorske disertacije pod nazivom: „Analiza mikroanatomskih, histoloških i imunohistohemijskih karakteristika ganglionu geniculi facijalnog živca oveka”, čiji je mentor doc. dr Milica Čekić Milisavljević, a komentor prof. dr Vaso Antunović, koja je odobrena od strane Naučnog veća, decembra 2013. godine.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisani-a ALEKSANDRA DOŽIĆ  
broj upisa \_\_\_\_\_

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom  
ANALIZA MIKROANATOMSKIH, HISTOLOŠKIH I IMUNOHISTOHEMIJSKIH  
KARAKTERISTIKA GANGLIONA GENICULI FACIJALNOG ŽIVCA ČOVEKA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, \_\_\_\_ 20.06.2016. \_\_\_\_

**Potpis doktoranda**

Aleksandra Dožić

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora \_\_\_\_\_ ALEKSANDRA DOŽIĆ \_\_\_\_\_  
Broj upisa \_\_\_\_\_  
Studijski program \_\_\_\_\_  
Naslov rada \_\_\_\_\_ ANALIZA MIKROANATOMSKIH, HISTOLOŠKIH I  
IMUNOHISTOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA GANGLIONA GENICULI  
FACIJALNOG ŽIVCA  
ČOVEKA \_\_\_\_\_  
Mentor \_\_\_\_\_ Doc. dr MILA ČETKOVIĆ-MILISAVLJEVIĆ \_\_\_\_\_  
Komentor \_\_\_\_\_ Prof. dr VASO ANTUNOVIĆ \_\_\_\_\_

Potpisani *Aleksandra Dožić*

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_ 20.06.2016. \_\_\_\_\_

*Aleksandra Dožić*

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:  
ANALIZA MIKROANATOMSKIH, HISTOLOŠKIH I IMUNOHISTOHEMIJSKIH  
KARAKTERISTIKA GANGLIONA GENICULI FACIJALNOG ŽIVCA ČOVEKA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_20.06.2016.\_\_\_\_

