

# Utjecaj antihistaminika desloratadina i bilastina na razvoj jetre i slezene Sprague Dawley štakora

---

**Putnik, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:706730>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Putnik**

**UTJECAJ ANTIHISTAMINIKA  
DESLORATADINA I BILASTINA NA  
RAZVOJ JETRE I SLEZENE SPRAGUE  
DAWLEY ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Putnik**

**UTJECAJ ANTIHISTAMINIKA  
DESLORATADINA I BILASTINA NA  
RAZVOJ JETRE I SLEZENE SPRAGUE  
DAWLEY ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer .

Rad ima 37 stranica i 16 slika.

## ZAHVALA

Ovom prilikom želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mariji Heffer, na stručnoj pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade diplomskoga rada.

Zahvaljujem se i asistentima Miloradu Zjaliću i Vedrani Ivić na strpljenju i pruženoj pomoći prilikom provedbe praktičnog dijela rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i rodbini na ogromnom razumijevanju i pruženoj podršci tijekom studija.

Hvala mom dečku, svim mojim prijateljima, IT stručnjaku, kolegama te ostalim dragim ljudima na zajedničkim trenucima, iskustvima, razgovoru, pruženoj podršci i prijateljstvu.

Od srca svima veliko hvala!

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Trudnoća u ljudi.....	1
1.2. Trudnoća u štakora .....	1
1.3. Lijekovi u trudnoći .....	2
1.4. Embrionalni razvoj jetre i slezene .....	3
1.5. Uloga jetre u metabolizmu lijekova.....	4
1.6. Uloga slezene u metabolizmu lijekova.....	5
1.7. Mastociti i histamin .....	6
1.8. Kolagenoza .....	7
1.9. Antihistaminici desloratadin i bilastin .....	7
2. HIPOTEZA .....	10
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	11
4. MATERIJALI I METODE .....	12
4.1. Ustroj studije.....	12
4.2. Materijali .....	12
4.3. Metode .....	12
4.3.1. Histološka bojanja.....	13
4.3.2. Statističke metode .....	17
5. REZULTATI.....	18
5.1. Histološki prikaz udjela dvostrukih jezgara u hepatocitima potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	18
5.2. Histološki prikaz omjera crvene i bijele pulpe slezene potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	20
5.3. Brojnost mitohondrija jetre potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	21
5.4. Nakupljanje mastocita u jetri potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	23
5.5. Prikaz vezivnog tkiva slezene potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	25
6. RASPRAVA.....	27
7. ZAKLJUČAK .....	30
8. SAŽETAK.....	31
9. SUMMARY .....	32

10. LITERATURA.....	33
11. ŽIVOTOPIS .....	37

## **POPIS KRATICA**

CYP citokrom P-450

DNA deoksiribonukleinska kiselina ( engl. *Deoxyribonucleic acid*)

IgE imunoglobulin E (engl. *immunoglobulin E*)

IFN interferon (engl. *interferon*)

MGF čimbenik rasta mastocita (engl. *mast cell growth factor*)

PTAH bojanje fosfovolframskom kiselinom i hematoksilinom ( engl. *Phosphotungstic acid-hematoxylin stain*)

TCR T-stanični receptor (engl. *T-cell antigen receptor*)

TH1 pomagački T-limfociti tip 1 (engl. *Type 1 T helper cells*)



## Popis slika i tablica

Slika 1. Prikaz posteljice i izmjene tvari .....	3
Slika 2. Histološki prikaz crvene i bijele pulpe slezene .....	14
Slika 3. Postupak obrade slike za kvantifikaciju udjela dvostrukih jezgara u ukupnom broju hepatocita .....	14
Slika 4. Postupak obrade slike za kvantifikaciju mitohondrija .....	15
Slika 5. Postupak obrade slike za kvantifikaciju retikulinskih vlakana slezene .....	16
Slika 6. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju jezgara u hepatocitima ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	18
Slika 7. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju jezgara u hepatocitima muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom .....	19
Slika 8. Prikaz udjela dvostrukih jezgara u broju hepatocita po vidnom polju muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. ....	19
Slika 9. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju omjera crvene i bijele pulpe slezene ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. ....	20
Slika 10. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju omjera crvene i bijele pulpe slezene muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. ....	21
Slika 11. Prikaz rezultata PTAH metode koja je korištena za kvantifikaciju količine mitohondrija u jetri ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	22
Slika 12. Prikaz rezultata PTAH metode koja je korištena za kvantifikaciju količine mitohondrija u jetri muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	23
Slika 13. Prikaz rezultata bojanja Toluidinskim modrilom koje je korišteno za određivanje broja mastocita u jetri ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	24
Slika 14. Prikaz rezultata bojanja Toluidinskim modrilom koje je korišteno za određivanje broja mastocita u jetri muških potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	24
Slika 15. Prikaz rezultata pikrosirijus bojanja koje je korišteno za kvantifikaciju postotnog udjela retikulinskih vlakana slezene u vidnom polju ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	25
Slika 16. Prikaz rezultata pikrosirijus bojanja koje je korišteno za kvantifikaciju postotnog udjela retikulinskih vlakana slezene u vidnom polju ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.....	26

## 1. UVOD

### 1.1. Trudnoća u ljudi

Trudnoća započinje implantacijom oplodene jajne stanice u endometriju maternice i traje u prosjeku 40 tjedana (1). Najčešće se dijeli u prvi, drugi i treći trimestar. Trudnoća se još može podijeliti na embrionalno i fetalno razdoblje. Embrionalno razdoblje je definirano kao vrijeme od implantacije do kraja 8. tjedna razvoja. Tijekom razdoblja embrija plod poprima oblik zametka tj. jednostavnog organizma. Embrionalno razdoblje se još naziva i kritično razdoblje jer tada teratogeni čimbenici uzrokuju najveće anomalije. Fetalno razdoblje se proteže od početka 9. tjedna gestacije do rođenja, karakteriziraju ga brzi rast fetusa i diferencijacija stanica. (1, 2, 3). Razvoj i rast u velikoj mjeri ovisi o genetskim, placentarnim i majčnim čimbenicima. Stanice prekursora, bez obzira na njihovo razdoblje u razvoju, vrlo su osjetljive na poremećaje izazvane teratogenom, koji mogu negativno utjecati na njihov opstanak, brzinu proliferacije, migracijsku aktivnost, sposobnost diferencijacije ili pravilno funkcioniranje stanice (2). Fiziološke promjene u trudnoći od iznimne su važnosti za normalan rast i razvoj djeteta, a posljedica su djelovanja hormona koje stvara posteljica. Fetomaternalni organ, odnosno posteljica, povezuje preko pupčane vrpce plod sa zidom maternice. Placentarna barijera je polupropusna opna koja štiti fetus od štetnih tvari, omogućuje ishranu fetusa, razmjenu plinova, odstranjuje otpadne tvari i sintetizira hormone (3, 4). Krv majke i fetusa se ne miješa zbog placentarne barijere, ali molekule lijekova mogu prelaziti barijeru.

### 1.2. Trudnoća u štakora

Trudnoća kod štakora obično traje 22 dana. Implantacija započinje peti dan kad se embrij smješta u zid maternice, a završava sedmi dan trudnoće. Spolni hormoni utječu na brzinu razvoja embrija nakon implantacije. Nakon organogeneze, embrij ulazi u fazu sazrijevanja, vrijeme kad ograni rastu i postaju funkcionalni. Tijekom razvoja toksikološki i okolišni čimbenici mogu dovesti do štetnih učinaka na plod. Kod trudne štakorice se primjećuje debljanje i razvoj mliječnih žlijezda. Majčine potrebe u trudnoći su jednostavne, a uključuju povećanu potrebu za hranom i mjesto za gniježđenje nekoliko dana prije poroda. Uobičajna veličina legla je od 8 do 18 mladunaca (5, 6).

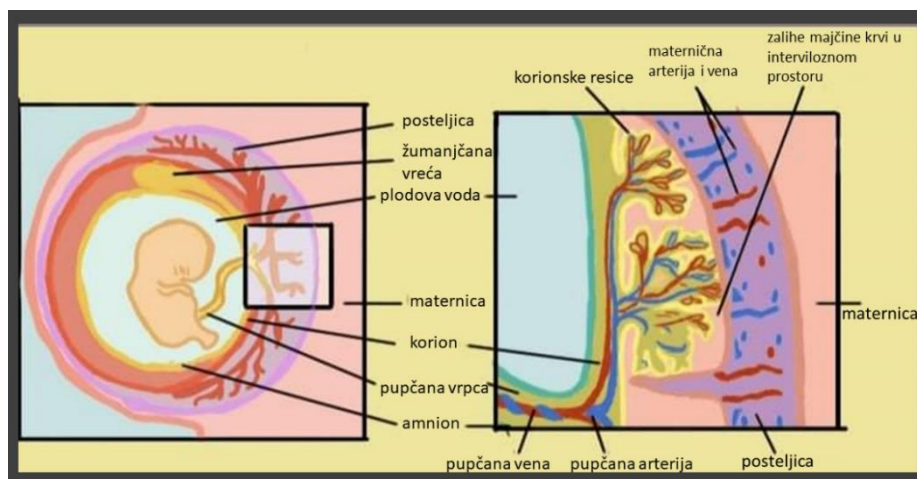
Istraživanja su pokazala da parametri analize krvi majke pokazuju sličnosti između trudnoće u ljudi i štakora (7). Funkcija posteljice štakora ima slične karakteristike kao i kod čovjeka, no postoje strukturne razlike kao i razlike u ekspresiji proteina. Budući da zbog etičkih razloga istraživanja na plodu, čovjeka, nisu dozvoljena, istraživanja provedena na animalnim modelima

nadopunjuju naše razumijevanje razvoja ljudskog organizma, utjecaja štetnih tvari i razvoja bolesti. No treba biti jako oprezan kako će se dobiveni rezultati na animalnim modelima tumačiti na ljudskoj populaciji (7, 8).

### **1.3. Lijekovi u trudnoći**

Istraživanja pokazuju da trudnice koriste barem jedan lijek za vrijeme trudnoće. Dokazano je da uzimanje lijekova u trudnoći uzrokuje 3 % više prirodnih malformacija (9). Nakon talidomidske tragedije krajem pedesetih i početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća posebno je pojačana usredotočenost na izbjegavanje uzimanja potencijalno teratogenih lijekova u trudnoći (10). Prilikom formiranja organa čeda, zbog farmakodinamike i farmakokinetike lijeka, može doći do prelaska lijeka preko placentarne barijere ili do patofizioloških promjena cijelog metabolizma koje mogu utjecati na razvoj fetusa (9). Temeljni princip farmakologije je da lijek treba dospjeti u ciljano tkivo u dovoljnoj koncentraciji kako bi izazvao terapijski učinak bez neželjnih nuspojava (11). Lijekovi prolaze kroz posteljicu u ovisnosti o veličini molekule, liposolubilnosti i stupnju ionizacije. Male ionizirane molekule lako prolaze placentarnu barijeru pasivnom difuzijom dok se veće molekule prenose putem transportnih proteina (12).

Lijekovi mogu neposredno utjecati na fetus uzrokujući oštećenje, defekte u razvoju ili smrt. Lijekovi mogu interferirati s prijenosom hranjivih tvari kroz placentu i tako utjecati na razvoj fetalnog tkiva (13). Uzimajući u obzir da je više od 50 % neplaniranih trudnoća, ženama u generativnoj dobi prilikom propisivanja lijekova liječnici trebaju pristupiti s visokom dozom opreza. Najbolje je propisati lijekove koji su se ispostavili neškodljivi u većini slučajeva, a isto tako i krenuti terapiju s najmanjom učinkovitom dozom (13, 14). Stadij trudnoće tijekom kojega dolazi do uzimanja lijeka određuje vjerojatnost, karakteristike i težinu anomalije, a preporučuje se da u prvih osam tjedana trudnoće trudnice izbjegavaju konzumaciju lijekova (14). Poznato je da u stadiju blastociste embrij ili propada ili se oštećene stanice zamjenjuju novim dovodeći do normalnog razvoja (13). Izlaganje lijekovima u stadiju organogeneze najveći je rizik za teže defekte dok nakon organogeneze lijekovi ne uzrokuju prirodene malformacije nego mijenjaju normalno funkcioniranje organa (14).



**Slika 1. Prikaz posteljice i izmjene tvari**

Sliku je izradila autorica

#### 1.4. Embrionalni razvoj jetre i slezene

Formiranje jetre započinje tijekom rane gestacije. Prvi morfološki znak embrionalne jetre je formiranje divertikuluma. Dio jetrenog divertikuluma stvara jetru i intrahepatično bilijarno stablo, a drugi dio tvori žučni mjehur i ekstrahepatične žučne kanale. U prvoj fazi razvoja jetre, specifikacija, stanice iz endoderma diferenciraju se u hepatoblaste. Ovaj proces popraćen je stvaranjem jetrenog pupoljka i ekspanzijom stanica. Jetreni pupoljak prolazi kroz period ubrzanog rasta potaknut vaskularizacijom okolnih stanica i postaje primarno mjesto fetalne hematopoeze, a također dovodi do sazrijevanja portalne vene. Nakon specifikacije, stvaranje jetrenog vaskularnog sustava napreduje tijekom embriogeneze, oslanjajući se na angiogenezu kako bi se stvorila složena vaskularna mreža (15 - 18). Fetalna jetra je u kontaktu s dva glavna venska sustava, umbilikalne vene i vitelične (razvojne) vene. Vitelične vene sudjeluju u stvaranju eferentnog venskog sustava jetre. Umbilikalna vena je glavna aferentna žila u jetri fetusa, ali je njezina prisutnost prolazna i nestaje nakon rođenja. Kako umbilikalna vena propada, portalna vena zamjenjuje je kao glavnu aferentnu venu dok se razvoj jetrene arterije javlja kasnije. Unutar jetre odrasle osobe žučni kanal, portalna vena i jetrena arterija teku paralelno i tvore „portalnu trijadu“. Portalna trijada okružena je hepatocitima koji nastaju tijekom diferencijacije epitelnih stanica. Hepatoblasti sazrijevaju u hepatocite, glavne parenhimalne stanice jetre, ili se diferenciraju u kolangiocyte. Ostale stanice kao što su Kupfferove stanice, fibroblasti i leukociti primarno potječu iz mezoderma (15 - 18).

Slezena, najveća nakupina limfnog tkiva u organizmu, sekundarni je limfni organ koji filtrira krv i ima glavnu ulogu u obrani organizma. Ovalnog je oblika, a obavijena je čahurom

od gustog vezivnog tkiva (19). Slezena započinje svoj razvoj u 5. tjednu trudnoće, a od 9. tjedna zajedno s fetalnom jetrom započinje eritropoezu. Vodeću ulogu u eritropoezi ima do 28. tjedna trudnoće kada tu funkciju preuzima koštana srž (20). Većina studija opisuje slezenu kao spoj mezodermalnog mezenhima na lijevoj strani mezogastrijuma. Smatra se da se razvoj slezene može podijeliti u dvije faze: prva faza do 14. tjedna gestacije ima mezenhimalni karakter s primarnim vaskularnim retikulumom, dok se u dugoj fazi razvijaju crvena i bijela pulpa. U početku se mobilne stanice distribuiraju po cijeloj slezeni pa se vremenom počinju nakupljati u venskim sinusima i dolaze u kontakt s venskim sustavom. Endotelna stijenka sinusa ostaje isprekidana, što potvrđuje teoriju o „otvorenoj“ vaskularizaciji slezene. Razvoj bijele pulpe započinje od 18. tjedna gestacije. Nakupljanje limfocita oko središnjih arterija može se prepoznati tijekom 19. i 20. tjedna gestacije. Ove limfoidne stanice pokazuju morfološke karakteristike preteča T-limfocita (21). U slezeni razlikujemo crvenu i bijelu pulpu unutar kojih su različito raspoređene imunološke stanice. Između crvene i bijele pulpe nalazi se marginalna zona koja sadržava malo limfocita, ali mnogo makrofaga. Crvenu pulpu izgrađuju slezenski tračci i sinusi. Tračke izgrađuju retikulinske stanice i vlakna, a sadržavaju makrofage, limfocite B i T, plazma stanice i sastojke krvi dok su sinusi slezene obavijeni endotelnim stanicama (19, 20). U sinusima se nalazi velika količina krvi po čemu je crvena pulpa i dobila ime. Crvena pulpa je ispunjena makrofazima i eritrocitima koji imaju ulogu u fagocitozi. Bijelu pulpu izgrađuje limfno tkivo, čine ju nakupine T-limfocita dok se na samim rubovima nalaze B-limfociti. Bijela pulpa se još naziva i pravi imunosni organ. Stanice slezene su najaktivnije u fagocitozi živih i neživih čestica koje dospiju u krv (19).

### **1.5. Uloga jetre u metabolizmu lijekova**

Jetra je parenhimatozni organ, smješten u abdominalnoj šupljini, a sastoji se od dva režnja. Bogato je opskrbljena krvlju jer posjeduje dvostruki cirkulacijski sustav. Većina krvi dolazi iz slezene i gastrointestinalnog trakta dok manji dio dolazi kroz jetrenu arteriju koja donosi krv bogatu kisikom (22). U fetalnom razdoblju ima ulogu stvaranja krvotvornih tkiva koju nakon rođenja preuzima koštana srž. Hepatociti, najsvestranije stanice u tijelu, glavne su jetrene stanice koje obavljaju većinu metaboličkih i sintetičkih funkcija (19, 22). To su stanice višekutna oblika čija citoplazma obiluje staničnim organelima. Udruženi hepatociti se povezuju u jetrene režnjiće koji čine osnovnu funkcionalnu jedinicu jetre (19).

Jetra se smatra glavnim metaboličkim organom našega organizma jer ima važnu ulogu u nizu metaboličkih procesa. U jetri se obavlja metabolizam ugljikohidrata, lipida, proteina, lijekova te razni procesi poput detoksikacije i konjugacije (22). Toksične i strane tvari u našem

organizmu kao što su i lijekovi, konjugiraju se u jetri s glukuronskom kiselinom te se prevode u spojeve koji su lakše topljivi, hidrofilniji i nisu štetni kako bi se daljnim procesima mogli izlučiti iz tijela. Najčešće se izlučuju iz tijela putem urina ili žuči (22). Spomenute se reakcije mogu podijeliti u tri faze. U prvoj fazi dolazi do promjene supstrata u polarnije, hidrofilnije molekule procesima oksidacije, redukcije i hidrolize. Najzastupljenije su reakcije oksidacije, katalizirane oksidazama miješane funkcije (CYP). Za hepatski metabolizam najvažniji su CYP1, CYP2 i CYP3. Zona u jetri, pogođena toksičnim djelovanjem, u kojoj se nalazi enzim biva najviše oštećena (23). U drugoj fazi zbivaju se reakcije konjugacije. U drugu fazu lijek ulazi u svom izvornom obliku ili kao metabolit nastao u prvoj fazi (23). Nakon konjugacije lijek je topljiv, netoksičan i spreman za ekskreciju (24). Enzimi koji kataliziraju drugu fazu su najčešće transferaze koje se nalaze u citoplazmi hepatocita. U trećoj fazi zbiva se ekskrecija metabolita iz hepatocita u žučne vodove i krv. Ekskreciju vrše transporteri koji su članovi ABC obitelji transmembranskih proteina (24).

U trudnoći, razvoj fetalne jetre kod fetusa od iznimne je važnosti jer što je jetra zrelija, njezini enzimi mogu bolje metabolizirati lijekove i smanjiti štetne učinke na fetus (9). Mnogi lijekovi mogu oštetiti jetru i dovesti do nekroze ili apoptoze hepatocita (25). No, gubitak jetrenog tkiva uzrokovan djelovanjem otrovnih tvari pokreće mehanizam pomoću kojega se hepatociti počnu dijeliti dok se izgubljeno tkivo ne nadoknadi pa zbog toga kažemo da jetra ima izvanrednu sposobnost regeneracije (19).

### **1.6. Uloga slezene u metabolizmu lijekova**

Kao multifunkcionalan organ slezena ima važne učinke na lokalni i sistemski imunološki odgovor koji utječe na različita tkiva i organe, ali isto tako je podložna promjenama uslijed izlaganja toksinima (26). Imunološke stanice slezene nastaju diferencijacijskim putem limfopoeze gdje nastaju sve vrste limfocita i diferencijacijskim putem mijelopoeze pri čemu nastaju fagociti, dendritičke stanice i posredničke stanice. Limfociti kao najvažnije stanice imunološkog sustava su nositelji specifične stanične imunosti. Uglavnom se nalaze u specifičnim limfatičnim organima, ali veliki dio tih stanica je pokretan, prelazi u krv, cirkulira pa dopijeva u različite organe (27).

Slezena je mjesto izravne i neizravne toksičnosti i meta je nekih kancerogenih oboljenja. Zbog svojih strukturnih karakteristika slezena je vrlo propusna za molekule koje se prenose krvlju. Parenhim slezene djeluje kao distribucijska platforma za brojne lijekove, a količina lijeka koja ulazi u parenhim ovisi o protoku krvi u slezini. Nakon što krv uđe u slezenu, dolazi u bijelu pulpu preko marginalne zone ili u crvenu pulpu do slezenskih tračaka. No s obzirom

da je najveći protok krvi u slezeni usmjeren na bijelu pulpu, tipovi stanica koje su izloženi lijekovima koji ulaze u parenhim iz krvi su limfociti i makrofazi. Interakcija lijeka s ove dvije vrste stanica može imati posljedice kako u pogledu terapijskog ili toksičnog djelovanja, tako i u pogledu distribucije lijekova. Makrofazi i limfociti mete su klinički važnih klasa lijekova, a također eksprimiraju i različite enzime koji metaboliziraju lijekove poput obitelji citokroma P450. Lijekovi mogu izazvati povećanje slezene s izravnim učinkom na stanice slezene ili kao nuspojava poremećaja u drugim organima, poput jetre dok neki lijekovi izazivaju tešku hemolizu povezanu sa splenomegalijom (28, 29).

Jetra i slezena su usko povezane portalnom cirkulacijom, a imaju i važnu ulogu u odstranjivanju patogena. Patološke promjene u slezeni doprinose oštećenju jetre, potičući fibrinogenezu, inhibiciju regeneracije te poremećaj imunološkog okružja jetre. Infekcije, bolesti jetre, napad patogena i maligna oboljenja nepovoljno utječu na ove organe uzrokujući njihovo povećanje ili smanjenje (30).

### 1.7. Mastociti i histamin

Alergije su najčešće medicinsko stanje koje može komplicirati trudnoću. Alergijska reakcija se razvija vezanjem antigena na B-limfocit koji dovodi do proizvodnje imunoglobulina E (engl. *Immunoglobulin E*, IgE) iz plazma stanice kako bi se novonastali imunoglobulini putem svojih Fc regija vezali za receptore na površini mastocita i bazofila. Upravo vezanje IgE za površinu stanice omogućuje brz odgovor na ponovni kontakt s antigenom. Kad se antigen nađe u organizmu veže se na IgE na površini stanice i dovodi do brze aktivacije koja za posljedicu ima degranulaciju mastocita i otpuštanje pohranjenog histamina i serotonina (31).

Mastociti potječu od pluripotentne matične stanice u koštanoj srži, koja izražava CD 34 antigene. Proliferira i sazrijeva pod utjecajem čimbenika rasta za mastocite (engl. *mast cell growth factor*, MGF). Mastociti su okruglog ili ovalnog oblika, ovisi u kojem se organu nalaze. Malenu, okruglu jezgru okružuje citoplazma koja je ispunjena bazofilnim zncima. Mastociti su primarna celularna komponenta u alergijskim reakcijama. Alergen ulazeći u organizam uzrokuje stvaranje IgE antitijela koja se vežu na mastocite i oslobađaju medijatore upale. Mastociti imaju receptore na membrani visokog afiniteta za IgE. Smješteni su uz krvne i limfne žile, na mjestima mogućeg oštećenja tkiva kao i u vezivnom tkivu većine organa. Prisutni su u mukozi respiratornog i gastrointestinalnog trakta kao i u koži (19, 32). U citoplazmatskim zncima mastocita pohranjen je kemijski posrednik upalne reakcije, histamin.

Histamin, biogeni amin, nastaje iz histidina. U organizmu ga nalazimo u većini tkiva. Otpuštanje histamina izazivaju: kemijske tvari, otrovi, toksini, endogeni posrednici i

imunološki mehanizmi ovisni o IgE protutijelu (33). Tijekom alergijske reakcije histamin se iz mastocita oslobađa egzocitozom (34). Regulira proliferaciju pomagačkih T-limfocita tipa 1 (engl. *Type 1 T helper cells, TH1*) i produkciju interferona (engl. *Interferon, IFN*), ekspresiju molekula stanične adhezije i kemotaksiju eozinofila i neutrofila (35). Izaziva simptome kao što prekomjerno izlučivanje sluzi, crvenilo, svrbež i otežano disanje. Histamin se oslobađa i kada mastociti otkriju ozljedu povećavajući protok krvi do mjesta ozljede ili infekcije (33). Histamin djeluje preko svojih receptora koji su podjeljeni u četiri skupine: H1, H2, H3 i H4 receptori (34). Putem H1 receptora histamin doprinosi regulaciji stanične proliferacije i diferencijacije, regulira embrionalni razvoj i sudjeluje u regeneraciji i zacjeljivanju rana. Doprinosi neurotransmisiji središnjeg živčanog sustava te regulira budnost (35). Antagonisti H1 receptora inhibiraju oslobađanje histamina, ali i drugih posrednika upale te se koriste za ublažavanje simptoma alergije (34).

### **1.8. Kolagenoza**

Smatra se da primjenom antihistaminika dolazi do razaranja vezivnog tkiva slezene i jetre te posljedično dolazi i do razvoja kolagenoze. Vezivno tkivo je nosilac oblika i ustroja tijela, povezuje stanice i organe te im pruža mehaničku potporu i oblik (19). Kolagenoza pripada skupini bolesti vezivnog tkiva. Razaranja veziva i progresivni tijek ove bolesti često dovode do fatalnog ishoda. Bolest može zahvatiti sve organske sustave. U ovu skupinu bolesti spadaju sistemski erimatozni lupus, sistemska sklerodermija, reumatoidni artritis i druge. Sam mehanizam bolesti nije poznat, ali se smatra da lijekovi ili virusi i bakterije izazivaju promjene na tkivu tako da ih organizam prepoznaje kao strane te uključuje obrambeni mehanizam koji ih uništava (32, 33). Uz pogrešku prepoznavanja vlastitog od tuđeg, također se smatra da je kolagenoza imunopatološki proces koji narušava razmjenu kolagena (36, 37). Kolagenoza je većinom nasljedna bolest, a oboljevaju žene reproduktivne dobi i stoga se često pojavljuje u trudnoći. Kolagenoza ne smanjuje mogućnost začeća, ali mijenja tijek i ishod trudnoće. Dolazi do pobačaja, intrauterinog zastoja u rastu i prijevremenog poroda. U novorođenčeta se javlja poremećaj funkcije jetre, trombocitopenija te kožne manifestacije bolesti (36, 37).

### **1.9. Antihistaminici desloratadin i bilastin**

Antihistaminici su skupina lijekova koji inhibiraju različita histaminska djelovanja. Antihistaminici prve generacije prolaze placentarnu i krvno-moždanu barijeru, imaju vrlo moćan učinak s visokom lipofilnošću, ali i kratko djelovanje. Metaboliziraju se u jetri pomoću citokroma P450, a glavne su im nuspojave sedacija i antikolinergički učinici (38). U drugu generaciju antihistaminika spadaju desloratadin i bilastin. Imaju visoki terapijski indeks sa



selektivnim djelovanjem i nesedirajući su. Dugodjelujući su, prolaze placentarnu barijeru, ali su slabo lipofilni te ne prolaze u središnji živčani sustav (38). Antagonisti H1 receptora koriste se za ublažavanje alergijskih dermatoloških i nedermatoloških stanja, a u trudnoći se koriste za liječenje mučnina (38, 39). Simptome alergijskog rinitisa kao što su začepljen nos, crvenilo očiju i pretjerano suženje aktiviraju alergeni u zraku ili kućni alergeni. Smatra se da je alergijski rinitis jedno od najčešćih medicinskih stanja koji mogu zakomplicirati trudnoću. Javlja se kod 30 % žena u generativnoj dobi, a isto tako se kod 30 % žena za vrijeme trudnoće pojačavaju simptomi. Mogući razlozi su hormonske promjene i povećan volumen krvi u cirkulaciji koji dovode do povećanog razvijanja navedenih simptoma (40). Uloga antihistaminika je spriječiti, kompetitivnom inhibicijom, interakciju histamina i njegova receptora. Iako studije na životinjama ne pokazuju teratogeno djelovanje desloratadina i bilastina na fetus, ni jedan antihistaminik, danas na tržištu, nije klasificiran kao siguran za korištenje u trudnoći (38, 39). No, nije isključena potreba za primjenom antihistaminika koji selektivno djeluju na H1 receptore kod trudnica. Potencijalna korist lijeka može opravdati njenu uporabu unatoč potencijalnim rizicima (38, 39).

Desloratadin je metabolit lijekova druge generacije koji je dizajniran kako bi povećao učinkovitost lijeka, a smanjio nuspojave. Ima visoko terapijsko i selektivno djelovanje, a nema sedacijski učinak jer ne uzrokuje štetne učinke na živčani sustav (39,41). Desloratadin smanjuje tipične histaminergičke učinke na H1 receptore u bronhijalnom glatkom mišiću, kapilarama i glatkom mišiću probavnog trakta koji uključuju vazodilataciju, bronhokonstrikciju, bol i svrbež. Također se koristi za ublažavanje alergijskih stanja uključujući rinitis i kroničnu urtikariju. Korištenje ovoga lijeka često je u trudnoći, no problem je što su informacije o sigurnosti fetusa ograničene (42).

Bilastin je novi antihistaminik druge generacije za sustavnu primjenu koji nije izveden ni iz jednog drugog antihistaminika koji je trenutno na tržištu. Dugodjelujući je antagonist H1 receptora koji nema sedacijski učinak (39). Koristi se za liječenje alergijskog rinitisa, kronične urtikarije i mučnine kod trudnica. Poboljšava nazalne i okularne simptome te kvalitetu života. Primjenjuje se oralno u dozi od 20 mg. Posebno je koristan prilikom korištenja veće doze od standardne bez uzrokovanja štetnog učinka. Ne pokazuje ni antikolinergičke ni kardiotoksične učinke. Ima visoku specifičnost za H1 receptore, ali za ostalih 30 receptora (muskarinski, serotoniniski, adrenergički i drugi) pokazuje zanemarivu specifičnost (42). Bilastin se ne metabolizira u jetri putem citokroma P450 nego se izlučuje nepromijenjen putem bubrega i fecesa. Budući da se ne metabolizira u jetri smatra se da nema štetan utjecaj na jetru. Ne smije se konzumirati u vrijeme obroka jer mu se smanjuje bioraspoloživost. Bilastin je supstrat

transportera organskih aniona i P-glikoproteina. P-glikoprotein je prirodni detoksikacijski sustav, lokaliziran u normalnim tkivima koja imaju sekretornu funkciju. Uloga mu je zaštita organa od štetnih tvari i izbacivanje štetnih tvari iz stanica. Lokaliziran je u tankom i debelom crijevu, jetri, bubrezima, žučnom kanalu i u placenti. Pristutnost P-glikoproteina u placenti štiti plod od negativnog utjecaja lijekova. Veza s P-glikoproteinima dodatno smanjuje mogućnost sedacijskog učinka bilastina (35).

Nekolicina studija pokazuje da antihistaminici nisu štetni za plod. Ipak postoji mogućnost da sam lijek ili njegovi metaboliti prolazeći placentarnu barijeru djeluju na normalan razvoj organizma. U ovom istraživanju promatrat će se utjecaj primjene dva antihistaminika u majci na neka obilježja jetre i slezene u potomaka.

## **2. HIPOTEZA**

Antihistaminici desloratadin i bilastin djeluju na razvoj jetre i slezene potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom trudnoće tretirane antihistaminicima, a djelovanje se očituje povećanjem broja jetrenih mastocita, dok se u slezeni mijenja omjer bijele i crvene pulpe te dolazi do kolageneze.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja jesu:

1. Usporediti histološku građu jetre i slezene eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Usporediti broj mastocita i brojnost mitohondrija jetre eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu.
3. Usporediti količinu vezivnog tkiva te omjer crvene i bijele pulpe u slezeni eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao studija parova uspoređujući potomke netretiranih Sprague Dawley štakorica (kontrole) s potomcima štakorica tretiranih jednim od antihistaminskih lijekova desloratadinom ili bilastinom. U studiju je uključeno ukupno 36 životinja starosti 3 mjeseca, podjeljenih u tri skupine (u svakoj 6 ženki i 6 mužjaka): potomci Sprague Dawley štakorica koje nisu bile tretirane desloratadinom i bilastinom, potomci Sprague Dawley štakorica tretiranih desloratadinom i potomci Sprague Dawley štakorica tretiranih bilastinom.

### 4.2. Materijali

Istraživanje je napravljeno na arhivskom tkivu jetre i slezene prikupljenih u sklopu studije Bohdan Malaniak CSMC-RECOOP Young Scientists Research Award #014 2019-2020 Sztojkov-Ivanov-Gaspar: "Comprehensive pharmacokinetic study of antihistamine drugs in pregnant and non-pregnant rats and evaluation of their effect on brain development" koju je odobrilo Mađarsko etičko povjerenstvo za pokuse na životinjama, br. IV./3796/2015. Dopuštenje za dio studije koji je prikazan ovim diplomskim radom izdalo je Etičko povjerenstvo za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/20-08/07; Broj:2158-61-07-20-49; dana 15.5.2020.)

Tkiva potječu od potomaka ženki Sprague Dawley štakorica koje su bile tretirane jednim od antihistaminskih lijekova desloratadinom ili bilastinom (10 mg/kg *per os*) tijekom trudnoće, od 10. gestacijskog dana pa do okota. Njihovi potomci (po 6 mužjaka i 6 ženki u svakoj skupini) ostavljeni su na životu u standardnim laboratorijskim uvjetima do starosti od 3 mjeseca (odrasla dob). Navedeni štakori su eutanazirani te su prikupljena tkiva jetre i slezene.

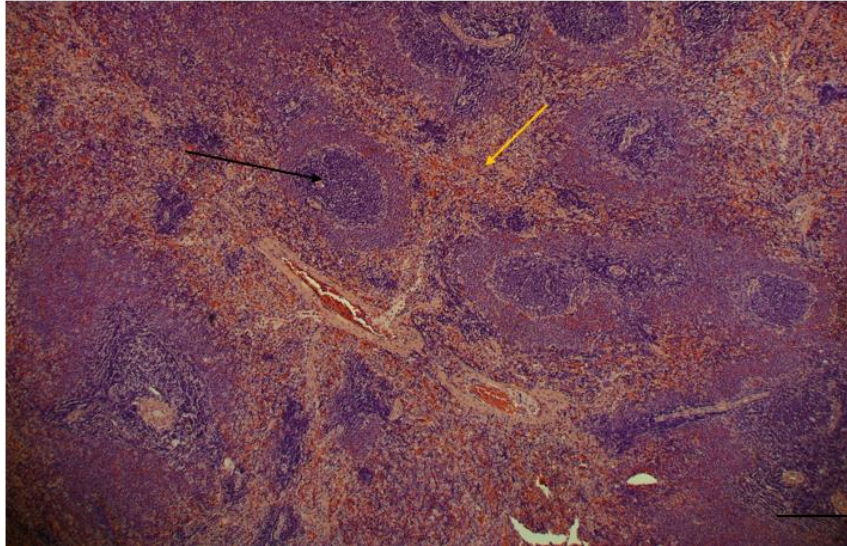
### 4.3. Metode

Tkivo jetre i slezene narezano je na mikrotomu (SM2000R Leica, Wetzlar, Njemačka) na debljinu od 5 µm. Rezovi su stavljeni na predmetna stakla. Za analizu histologije tkiva jetre rezovi su obojani klasičnim histološkim bojanjem hemalaunom i eozinom, Toluidinskim modrilom i bojanjem fosfovolframskom kiselinom i hematoksilinom (engl. *Phosphotungstic acid-hematoxylin stain*, PTAH). Za vizualizaciju tkiva slezene korišteni su hemalaun i eozin i prikrosirijus bojenje.

#### 4.3.1. Histološka bojanja

Hemalaun-eozin bojanje. Bojanje hemalaun-eozin najvažnije je bojanje u histologiji, služi za razlikovanje jezgre i citoplazme. Hemalaun je bazična boja pomoću koje se jezgre oboje plavo, a eozin je kisela boja koja ružičasto oboji citoplazmu. Ovim bojanjem obojene su slezena s ciljem određivanja omjera bijele i crvene pulpe i jetra s ciljem određivanja udjela dvostrukih jezgara hepatocita u ukupnom broju hepatocita po vidnom polju. Tkivo slezene i jetre uklopljeno je u parafin, narezano je na rezove debljine 5  $\mu\text{m}$  i stavljeno na predmetna stakla. Osušeni rezovi uronjeni su u ksilen dva puta po 10 minuta. Potom su rezovi rehidrirani u seriji etanola dva puta po 5 minuta u 100 %-tnoj, potom 96 %-tnoj, potom 70 %-tnoj otopini etanola. Rezovi su potom prebačeni u destiliranu vodu na 5 minuta. Zatim su rezovi inkubirani u boji hemalaun 10 minuta i nakon toga isprani jednu minutu u destiliranoj vodi te se boja razvijala u vodovodnoj vodi 10 minuta. Rezovi su isprani destiliranom vodom u trajanju od jedne minute. Slijedilo je bojenje eozinom u trajanju od 3 minute. Rezovi su brzo dehidrirani kroz seriju 96 %-tnog i 100 %-tnog etanola i potom su prebačeni u ksilen na 5 minuta iz kojeg su vađeni i odmah pokriveni. Rezovi su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi a potom su pokriveni medijem za pokrivanje Histomount medijem za pokrivanje histoloških preparata (National Diagnostics USA, Atalanta, Georgia, kataloški broj: HS-103, lot. 08-08-30).

Nakon fotografiranja na mikroskopu (Axioskop 2 MOT, Carl Zeiss, Jena, Germany) kamerom Olympus D70 (Olympus D70, optical Olympus, Japan) pri povećanju okulara i objektiva 50x u slučaju tkiva slezene i pri povećanju okulara i objektiva 400x u slučaju tkiva jetre. Fotografije tkiva jetre i slezene analizirane su u programu ImageJ (43). Prilikom analize fotografija tkiva slezene najprije je izmjerena površina slezene putem naredbe *Analyze – Measure* s namještenim postavkama za mjerenje površine, a potom s istim naredbama površina bijele pulpe na istoj fotografiji. Vezivno tkivo i krvne žile smo zanemarili. Površina crvene pulpe dobivena je oduzimanjem ukupne površine reza slezene od površine bijele pulpe. Dijeljenjem vrijednosti bijele i crvene pulpe s ukupnom vrijednošću površine dobiven je omjer površina koji se dalje koristio u statističkim analizama.

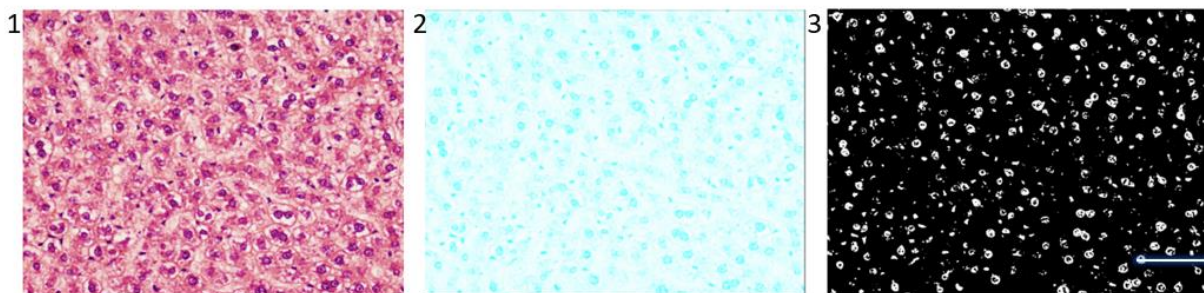


Slika 2. Histološki prikaz crvene i bijele pulpe slezene.

Veličina skale 2mm. Oznake: crna strelica: bijela pulpa; žuta strelica: crvena pulpa.

Fotografirala autorica.

Prilikom analize tkiva jetre najprije je odabrana fotografija iz koje su u programu ImageJ (43) zasebno izdvojeni crveni, plavi i zeleni kanali putem naredbe *Image – Color – Colour Deconvolution* (dekonvolucija). Odabran je kanal koji najprikladnije prikazuje jezgre hepatocita te je još upotrebljena naredba *Image – Adjust – Threshold*. Potom su u programu Image J (43) uz pomoć dodatka *Cell counter* izbrojani hepatociti s dvostrukom jezgrom te ukupan broj hepatocita u vidnom polju te su određeni udjeli dvostrukih jezgara u broju hepatocita.



Slika 3. Postupak obrade slike za kvantifikaciju udjela dvostrukih jezgara u ukupnom broju hepatocita. (1) Odabir fotografije. (2) Podjela slike na kanale, izabran zeleni kanal (dekonvolucija). (3) Izdvojene jezgre u hepatocitima. Veličina skale 200  $\mu\text{m}$ .

Fotografirala autorica.

Bojanje histoloških preparata jetre PTAH metodom učinjeno je radi utvrđivanja količine mitohondrija u jetri. Nakon bojanja mitohondriji budu plave boje. Bojanje tkiva PTAH metodom napravljeno je prema sljedećem protokolu (44):

1. deparafiniranje ksilenom i rehidriranje rezova u destiliranoj vodi, 1 minuta;
2. ispiranje destiliranom vodom, 5 minuta;
3. uranjanje u Langeronovu otopinu, 10 minuta;
4. tretiranje rezova s 5 %-tnim natrijevim tiosulfatom, 1 minutu;
5. ispiranje u destiliranoj vodi, 5 minuta;
6. bojanje s PTAH otopinom 2 sata pri temperaturi od 56 - 60 °C;
7. dehidriranje uzoraka u 95 %-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu i ksilenu.

PTAH otopina pripravljena je na sljedeći način: otopiti 1g hematoksilina ( $C_6H_{14}O_6$ ) i 500 mL destilirane vode pri temperaturi manjoj od 60 °C, ohladiti 10 minuta potom dodati 0,1777 g kalijevo permanganata i ostaviti da odstoji. U drugoj posudi pomiješati 500 mL destilirane vode i 20 g fosfovolframske kiseline (engl. *phosphotungtic acid*, PTA,  $H_3PW_{12}O_{40}$ ). Pripremljene otopine pomiješati i ostaviti da odstoje 1 mjesec. Nakon toga otopina je spremna za uporabu.

Nakon fotografiranja na mikroskopu kamerom Olympus D70, pri povećanju okulara i objektiva 400x fotografije su analizirane u programu ImageJ (43). Na izabranim fotografijama su dekonvolucijom izdvojeni crveni, plavi i zeleni kanal te je odabran kanal koji najprikladnije prikazuje mitohondrije u jetri. Sljedeći korak je obilježiti mitohondrije uz pomoć naredbe *Image – Adjust – Threshold*. Uz pomoć naredbe *Analyse – Measure* postavljeni su parametri za kvantifikaciju i izmjerena je površina slike koju zauzimaju mitohondriji. Analizirano je subkapsularno područje jetre i područje oko centralne vene.



Slika 4. Postupak obrade slike za kvantifikaciju mitohondrija. (1) Odabir fotografije. (2) Dekonvolucijom izabrani kanal uz prilagođen kontrast. (3) Prikaz mitohondrija. Veličina skale 200 $\mu$ m. Fotografirala autorica.

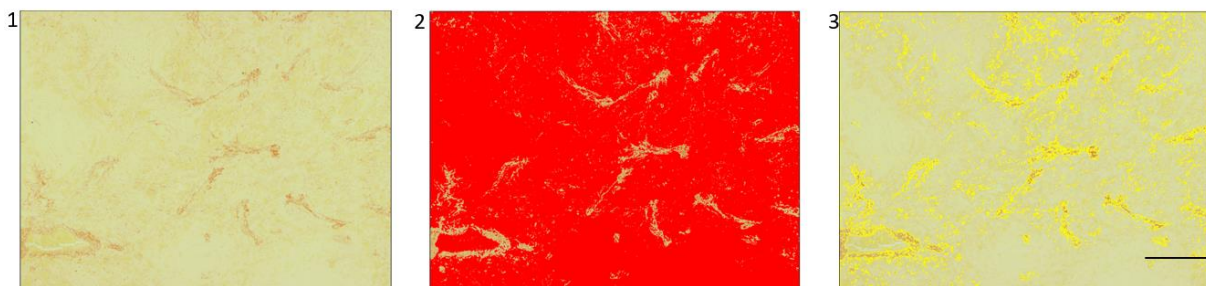


Toluidinsko modrilo. Za prikaz mastocita u jetri korišteno je Toluidinsko modrilo, fotografirano je područje direktno uz krvne žile. Toluidinsko bojenje napravljeno je prema sljedećem protokolu (44) :

1. deparafiniranje ksilenom i rehidriranje rezova u destiliranoj vodi;
2. uranjanje uzoraka u destiliranu vodu 5 minuta;
3. uranjanje uzoraka u otopinu kiselog 0,5 % toluidina pH = 0,5 u trajanju 20 minuta;
4. dehidriranje u nizu od 3 acetona i mješavini aceton:ksilen 50:50;
5. pročišćavanje u ksilenu dva puta po 5 minuta i naposljetku pokrivanje preparata pokrovnica uz pomoć medija Histomount.

Nakon bojenja preparati su fotografirani na mikroskopu kamerom Olympus D70 pri povećanju okulara i objektiva 200x. Fotografije su analizirane u programu ImageJ (43). Odabrana je željena fotografija. Uz pomoć programskog dodatka brojača stanica *Cell counter*, izbrojani su mastociti u vidnom polju koji su se dalje analizirali u statističkom programu.

Za prikaz vezivnog tkiva slezene korišteno je pikrosirijus bojenje. Stakalca s rezovima uronjena su u otopinu pikrosirijus i ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga su rezovi brzo dehidrirani u apsolutnom alkoholu. Preparati su fotografirani na mikroskopu kamerom Olympus D70 pri povećanju okulara i objektiva 100x. Fotografije su analizirane u programu ImageJ (43). Naredbom *Image – Adjust – Color Treshold* uz prilagođene parametre obilježena su retikulinska vlakna slezene. Uklonjeno je pozadinsko obojenje i uz korištenjem naredbe *Analyse – Measure* izmjeren je postotak površine koju zauzimaju retikulinska vlakna na slici.



Slika 5. Postupak obrade slike za kvantifikaciju retikulinskih vlakana slezene. (1) Odabrana fotografija. (2) Obilježena retikulinska vlakna. (3) Retikulinska vlakna s uklonjenom pozadinom. Veličina skale 500  $\mu\text{m}$ . Fotografirala autorica.

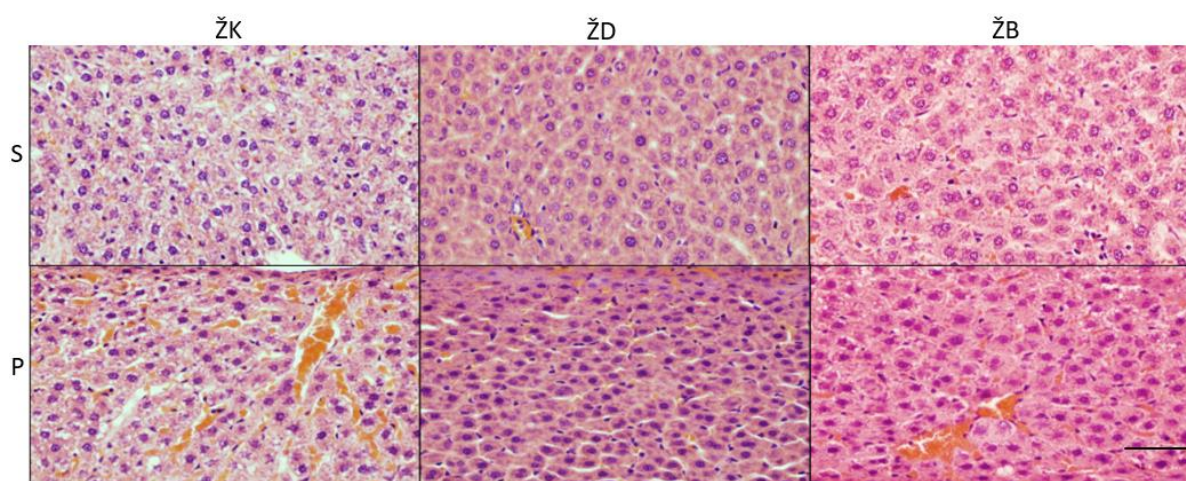
#### 4.3.2. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodjeljenih numeričkih varijabli između nezavisnih skupina testirane su ANOVA testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallis testom s pripadajućim post HOC testovima. Sve p vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je program Statistica12 (StatSoft Inc., TULSA, Oklahoma, SAD).

## 5. REZULTATI

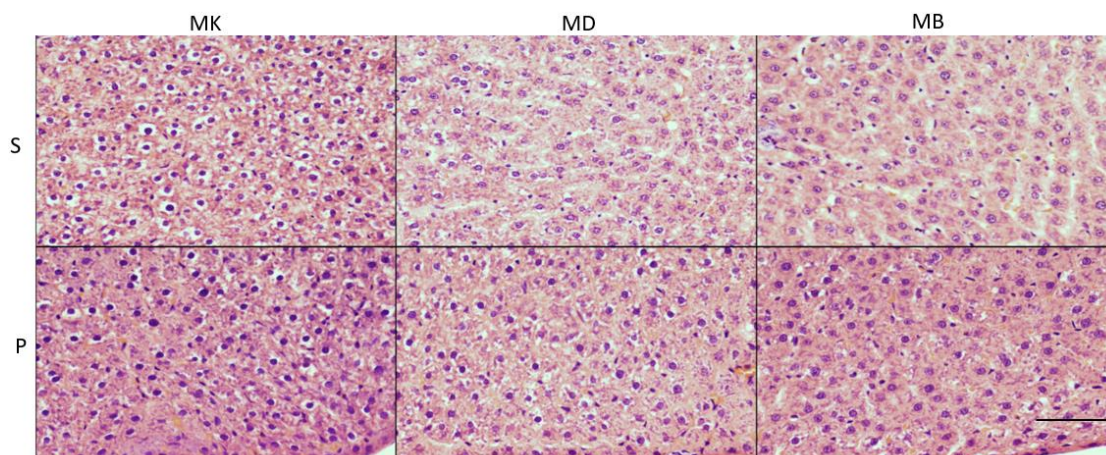
### 5.1. Histološki prikaz udjela dvostrukih jezgara u hepatocitima potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom

Najmanji udio dvostrukih jezgara u broju hepatocita imali su muški potomci Sprague Dawley štakorica tretiranih desloratadinom, a najveći udio dvostrukih jezgara imali su muški potomci štakorica netretiranih antihistaminicima (Slika 3). Udio dvostrukih jezgara u broju hepatocita kod ženskih štakorica koje nisu bile tretirane antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosio je 0,31 (SD = 0,07), kod ženskih potomaka štakorica tretiranih desloratadinom iznosio je 0,27 (SD = 0,07), a kod ženskih potomaka štakorica tretiranih bilastinom bio je 0,30 (SD = 0,05). Kod ženske skupine potomaka štakorica tretiranih desloratadinom i bilastinom nije dokazana statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije tretirana antihistaminicima.



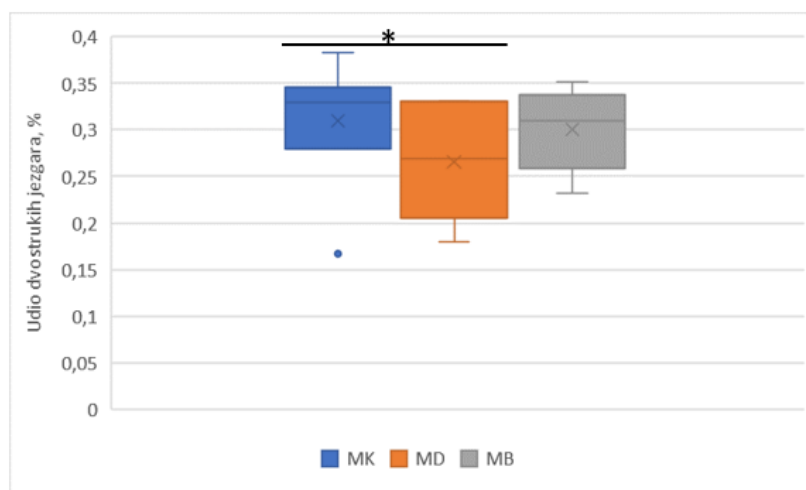
Slika 6. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju jezgara u hepatocitima ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: S – dio jetre bliže središnjem dijelu preparata; P – dio jetre bliže kapsuli; ŽK – ženski potomci štakorica koji nisu tretirani antishitaminicima desloratadinom i bilastinom; ŽD – ženski potomci štakorica tretiranih desloratadinom; ŽB – ženski potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 200  $\mu\text{m}$ , fotografirala autorica.



Slika 7. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju jezgara u hepatocitima muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: S – dio jetre bliže središnjem dijelu preparata; P – dio jetre bliže kapsuli; MK – muški potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 200  $\mu\text{m}$ , fotografirala autorica.



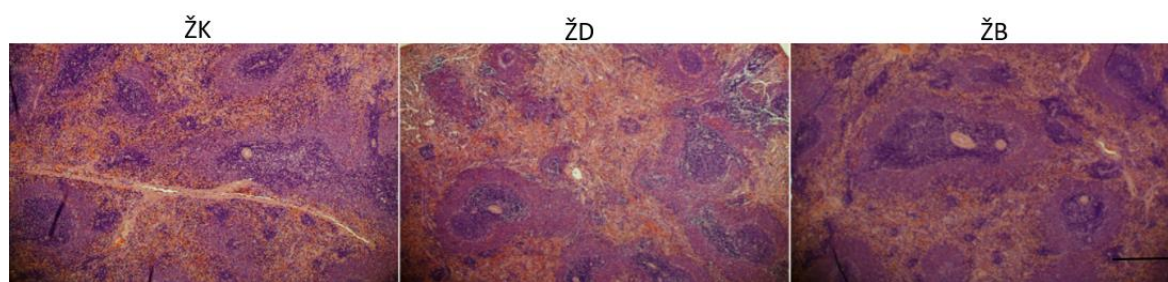
Slika 8. Prikaz udjela dvostrukih jezgara u broju hepatocita po vidnom polju muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

ANOVA test:  $F_{(2,17)} = 5,109$ ,  $p = 0,02$ . \* $p < 0,05$  Oznake: MK – muški potomci štakorica koje nisu tretirane antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom.



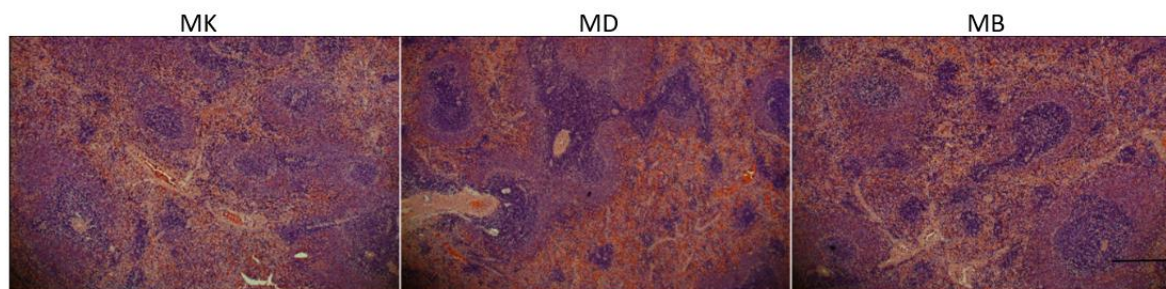
## 5.2. Histološki prikaz omjera crvene i bijele pulpe slezene potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom

Omjer crvene i bijele pulpe kod ženskih potomaka štakorica netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosio je 50,90 (SD = 9,75), dok je kod ženskih potomaka štakorica tretiranih desloratadinom iznosio 51,99 (SD = 12,27), a kod ženskih potomaka štakorica tretiranih bilastinom bio je 48,08 (SD = 6,95). Omjer crvene i bijele pulpe kod muških potomaka štakorica netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosio je 52,30 (SD = 11,87), dok je kod muških potomaka štakorica tretiranih desloratadinom iznosio 47,19 (SD = 4,73), a kod muških potomaka štakorica tretiranih bilastinom bio je 42,11 (SD = 9,82). Nije zabilježena statistički značajna razlika u omjeru crvene i bijele pulpe slezene između muških potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Također i kod ženskih potomaka štakorica tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije tretirana antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Korišten ANOVA test.



Slika 9. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun-eozinom koji je korišten za kvantifikaciju omjera crvene i bijele pulpe slezene ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: ŽK – ženski potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; ŽD – ženski potomci štakorica tretiranih desloratadinom; ŽB – ženski potomci štakorica tretiranih bilastinom. Veličina skale 2 mm, fotografirala autorica.

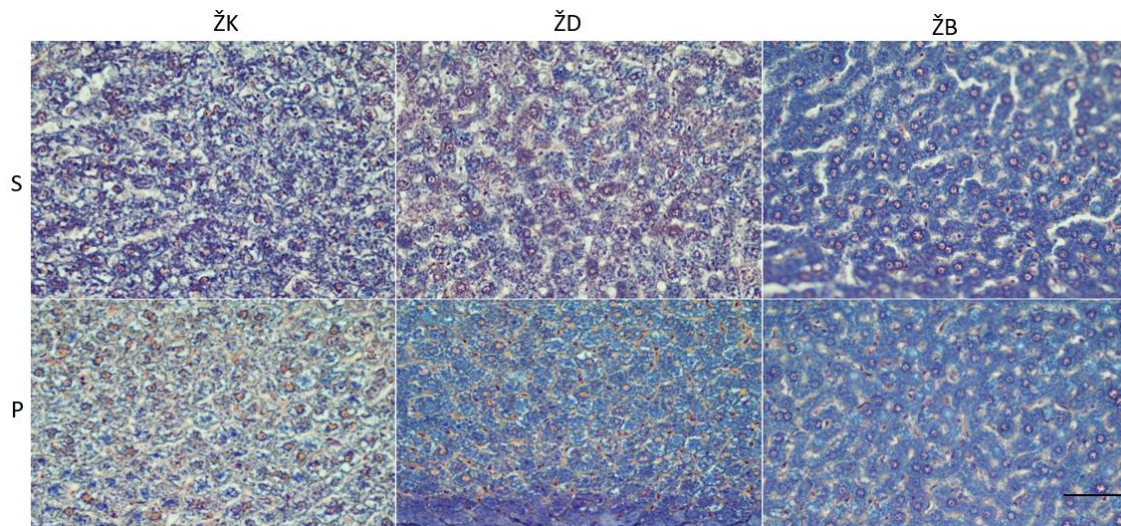


Slika 10. Prikaz rezultata histološkog bojanja hemalaun eozinom koji je korišten za kvantifikaciju omjera crvene i bijele pulpe slezene muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: MK – muški potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom. Veličina skale 2 mm, fotografirala autorica.

### **5.3. Brojnost mitohondrija jetre potomaka štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom**

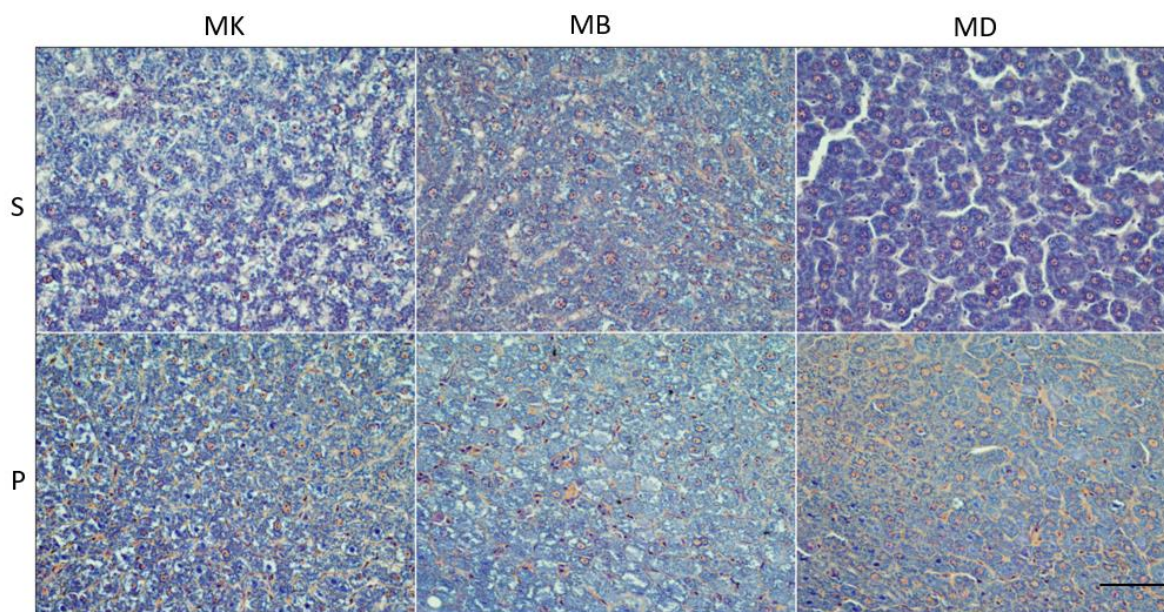
Brojnost mitohondrija kod ženskih potomaka štakorica koje nisu izložene antihistaminicima desloratadinu i bilastinu iznosila je 31,5 (SD = 1,76), kod ženske skupine potomaka štakorica koje su tretirane desloratadinom bila je 32 (SD = 9,03), a kod ženske skupine potomaka štakorica tretiranih bilastinom iznosila je 41 (SD = 7,85). Brojnost mitohondrija kod muških potomaka štakorica koje nisu izložene antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosila je 36,3 (SD = 9,48), kod muških potomaka štakorica koje su tretirane desloratadinom bila je 34,3 (SD = 7,50), a kod muških potomaka štakorica tretiranih bilastinom iznosila je 32,3 (SD = 5,43). Nije dokazana statistički značajna razlika u broju mitohondrija između potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Korišten ANOVA test.



Slika 11. Prikaz rezultata PTAH metode koja je korištena za kvantifikaciju količine mitohondrija u jetri ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: S – dio jetre bliže središnjem dijelu preparata; P – dio jetre bliže kapsuli; ŽK – ženski potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; ŽD – ženski potomci štakorica tretiranih desloratadinom; ŽB – ženski potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 200 µm, fotografirala autorica.





Slika 12. Prikaz rezultata PTAH metode koja je korištena za kvantifikaciju količine mitohondrija u jetri muških potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: S – dio jetre bliže središnjem dijelu preparata; P – dio jetre bliže kapsuli; MK – muški potomci štakorica koji nisu tretirani antishitaminicima desloratadinom i bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu.

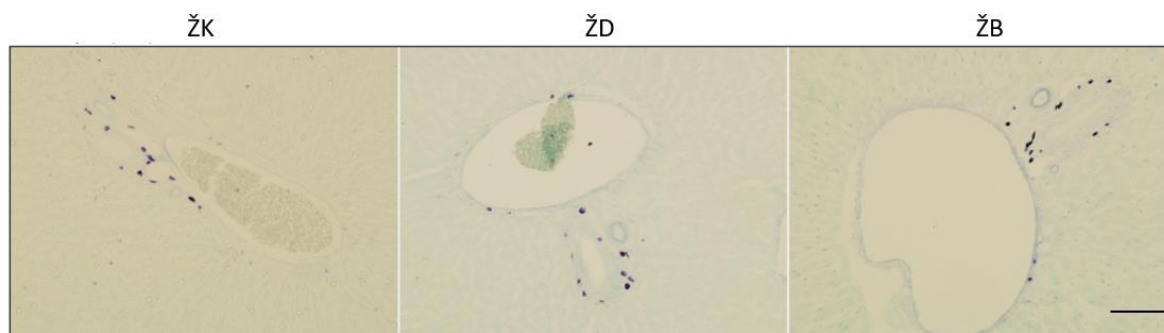
Veličina skale 200  $\mu\text{m}$ , fotografirala autorica.

#### **5.4. Nakupljanje mastocita u jetri potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom**

Broj mastocita u jetri kod ženskih potomaka štakorica koje nisu bile tretirane antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosio je 18 (SD = 4,23), kod ženskih potomaka tretiranih desloratadinom bio je 22 (SD = 6,31) dok kod ženskih potomaka štakorica tretiranih bilastinom iznosio je 20 (SD = 2,8). Nije zabilježena statistički značajna razlika u broju mastocita u jetri između ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Broj mastocita u jetri kod muških potomaka štakorica koje nisu tretirane antihistaminicima desloratadinom i bilastinom bio je 23 (SD = 5,42), kod muških potomaka tretiranih desloratadinom iznosio je 22 (SD = 6,31) dok je kod muških potomaka štakorica tretiranih bilastinom iznosio 20 (SD = 2,8). Također nije zabilježena statistički značajna razlika u broju mastocita u jetri između muških potomaka

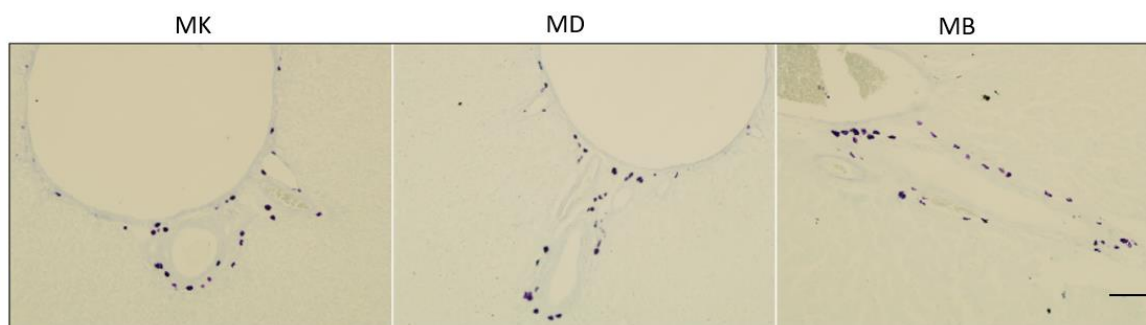


Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Korišten ANOVA test.



Slika 13. Prikaz rezultata bojanja Toluidinskim modrilom koje je korišteno za određivanje broja mastocita u jetri ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: ŽK – ženski potomci štakorica koji nisu tretirani antishitaminicima desloratadinom i bilastinom; ŽD – ženski potomci štakorica tretiranih desloratadinom; ŽB – ženski potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 200  $\mu$ m, fotografirala autorica.

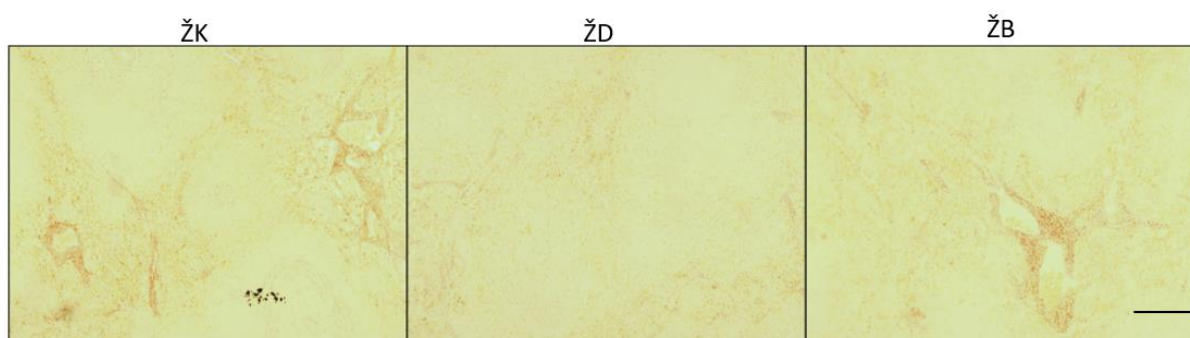


Slika 14. Prikaz rezultata bojanja Toluidinskim modrilom koje je korišteno za određivanje broja mastocita u jetri muških potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih i netretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: MK – muški potomci štakorica koji nisu tretirani antishitaminicima desloratadinom i bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom.. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 200  $\mu$ m, fotografirala autorica

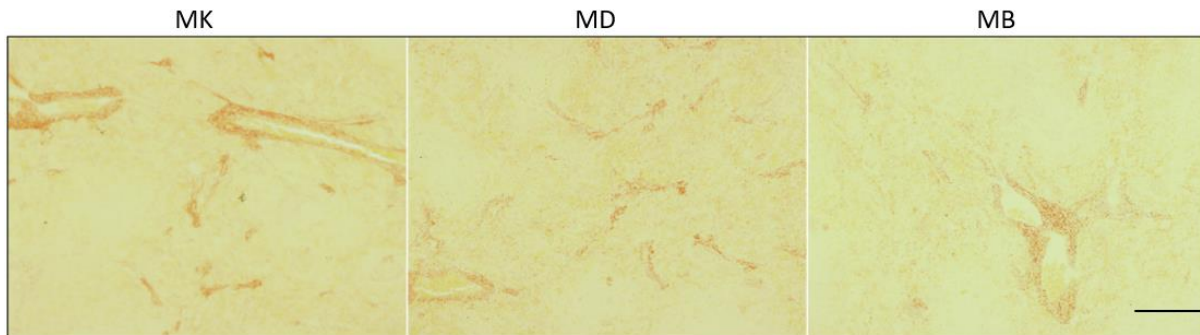
### 5.5. Prikaz vezivnog tkiva slezene potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom

Postotni udio retikulinskih vlakana po vidnom polju kod ženskih potomaka štakorica koje nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom iznosio je 41 (SD = 9,2), kod ženskih potomaka štakorica tretiranih desloratadinom iznosio je 49,5 (SD = 6,41) dok je kod ženskih potomaka štakorica tretiranih bilastinom iznosio 46,8 (SD = 10,5). Nije dokazana statistički značajna razlika u postotnom udjelu retikulinskih vlakana slezene između ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Postotni udio retikulinskih vlakana kod muških potomaka štakorica koje nisu tretirane antihistaminicima desloratadinom i bilastinom bio je 44 (SD = 10,79), kod muških potomaka štakorica tretiranih desloratadinom iznosio je 42,5 (SD = 13,16), a kod muških potomaka štakorica koje su tretirane bilastinom bio je 37,5 (SD = 9). Nije dokazana statistički značajna razlika u postotnom udjelu retikulinskih vlakana ni kod muških potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Korišten ANOVA test.



Slika 15. Prikaz rezultata pikrosirijus bojanja koje je korišteno za kvantifikaciju postotnog udjela retikulinskih vlakana slezene u vidnom polju ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: ŽK – ženski potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; ŽD – ženski potomci štakorica tretiranih desloratadinom; ŽB – ženski potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 500  $\mu\text{m}$ , fotografirala autorica.



Slika 16. Prikaz rezultata pikrosirijus bojanja koje je korišteno za kvantifikaciju postotnog udjela retikulinskih vlakana slezene u vidnom polju ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom.

Oznake: MK – muški potomci štakorica koji nisu tretirani antihistaminicima desloratadinom i bilastinom; MD – muški potomci štakorica tretiranih desloratadinom; MB – muški potomci štakorica tretiranih bilastinom. Na slikama se vidi reprezentativni dio preparata za svaku skupinu. Veličina skale 500  $\mu\text{m}$ , fotografirala autorica.

## 6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj korištenja antihistaminika desloratadina i bilastina tijekom trudnoće na razvoj jetre i slezene potomaka Sprague Dawley štakorica. Smatra se da antihistaminici desloratadin i bilastin prolazeći placentarnu barijeru štetno utječu na razvoj fetusa ukoliko se primjenjuju u kritičnim razdobljima trudnoće kao što su prvi trimestar i organogeneza (9). Opsežne studije uključujući i studiju iz Sjeverne Amerike istraživača Qian Li, Mitchel A.A. i suradnika nisu utvrdile vezu između antihistaminika i većih urođenih malformacija organa. Mnoge prethodne studije, koje dovode u vezu konzumaciju antihistaminika i urođene malformacije organa, uključivale su višestruku usporedbu i mali broj slučajeva stoga te studije nemaju dovoljnu znanstvenu težinu (45).

Histološkim bojanjem hemalaunom i eozinom rezova jetre određen je udio dvostrukih jezgara u broju hepatocita. Ovom studijom pokazano je da se kod muških potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih desloratadinom broj dvostrukih jezgara u jetri smanjuje s obzirom na kontrolnu skupinu koja nije tretirana desloratadinom. Funkcija dvostrukih jezgara u hepatocitima povezuje se s različitim funkcijama jetre kao što su metabolizam i detoksikacija lijekova. Prosesi u jetri su učinkovitiji kod stanica s dvije jezgre. Naime, stanice sadrže veću količinu DNA što utječe na ekspresijski profil određenih gena čime se povećava metabolička plastičnost stanice. Dvostruke jezgre štite stanicu od tumorigeneze i apoptoze osiguravajući joj normalno funkcioniranje (46, 47, 48). Budući da se desloratadin metabolizira u jetri, studije pokazuju da je primjena ovoga lijeka povezana s povišenom vrijednošću jetrenih enzima. Iako se najčešće radi o asimptomatskim slučajevima, u manjem broju primjenom desloratadina dolazi do klinički lakše ozljede jetre (41). Smanjenje broja višejezgrenih hepatocita kod muških potomaka desloratadinom tretiranih štakorica ukazuje na moguću veću podložnost muških potomaka jetrenim tumorima i slabiju funkcionalnost jetre.

Budući da se bilastin ne metabolizira u jetri nego se nepromijenjen izlučuje putem bubrega i fecesa, smatra se da ne djeluje štetno na jetru i njen razvoj (35). Ovom studijom to je i potvrđeno jer nije dokazana statistički značajna razlika između potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih bilastinom i kontrolne skupine koja nije tretirana antihistaminikom bilastinom.

Histološkim bojanjem hemalaunom i eozinom određen je omjer crvene i bijele pulpe slezene. Dokazano je da omjer crvene i bijele pulpe slezene ostaje nepromijenjen, odnosno da primjena antihistaminika desloratadina i bilastina, antihistaminika druge generacije sa

smanjenim nuspojavama ne dovodi do štetnog utjecaja na razvoj slezene potomaka Sprague Dawley štakorica (38, 39). Slezena ima važnu ulogu u obrani organizma, imunološkim odgovorom utječe na različite organe i tkiva, ali isto tako izlaganje slezene toksinima dovodi do poremećaja omjera crvene i bijele pulpe slezene (18, 19, 20). Histaminski H4 receptori se u slezeni eksprimiraju na imunološki stanicama koje otpuštaju histamin nakon stimulacije antigenom. Histaminski receptori imaju značajnu ulogu u kemotaksiji koja je povezana s imunskim i upalnim odgovorom slezene (49, 50). Istraživanja su pokazala da primjenom antihistaminika u trudnoći, na životinjskim modelima, ne dolazi do oštećenja organa (39, 51).

Vezivno tkivo slezene eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu uspoređeno je nakon bojanja pikrosirijusom. Vezivno tkivo povezuje stanice i organe te im daje oblik i mehaničku potporu. Smatra se da izlaganje toksinima dovodi do razaranja vezivnog tkiva i do razvoja kolagenoze (19, 36, 37). Ovom studijom nije utvrđeno da antihistaminici razarajuće djeluju na vezivno tkivo slezene odnosno da smanjuju broj retikulinskih vlakana u potomaka antihistaminicima tretiranih trudnica. Na temelju postojećih dokaza primjena druge generacije antihistaminika nije povezana s povećanim rizikom oštećenja slezene kod trudnica (32).

Bojanjem tkiva Toluidinskim modrilom određen je broj mastocita u jetri. Tijekom ulaska alergena u organizam stvaraju se IgE protutijela koja se vežu na mastocite. Povećava se broj mastocita u jetri i oslobađaju se medijatori upale kao što je histamin koji dovode do razvoja alergijskih simptoma. Sposobnost antagonista histaminskih receptora da inhibiraju degranulaciju mastocita sugerira da su antihistaminici stabilizatori mastocita. Smanjen broj odnosno aktivnost mastocita štiti jetru od ozljede i omogućuje njeno normalno funkcioniranje (19, 22, 52). Ovom studijom pokazano je da primjenom antihistaminika ne dolazi do značajnog povećanja broja mastocita između skupina tretiranih antihistaminicima i kontrolne skupine.

Mitochondriji su „energetska centrala stanice“ odnosno stanični organeli kojima je glavna uloga proizvodnja energije. Jetra je jedan od organa najbogatijih mitochondrijima. Jetreni mitochondriji imaju jedinstvene značajke u usporedbi s mitochondrijima drugih organa, jer su u središtu metabolizma ugljikohidrata, lipida i proteina u jetri. Stoga je pravilno funkcioniranje mitochondrija jetre neophodno za sprečavanje bolesti jetre. Mitochondriji su također bitni u preživljavanju hepatocita kao posrednici apoptoze i nekroze. Smrt hepatocita uključena je u većinu patologija jetre jer obavljaju većinu metaboličkih i sintetičkih funkcija. Stoga su hepatociti razvili različite mehanizme kako bi zadržali integritet mitochondrija ili spriječili učinke lezija mitochondrija (53). Brojnost mitochondrija jetre određena je PTAH metodom i

utvrđeno je da količina mitohondrija u stanicama jetre ostaje očuvana unatoč primjeni antihistaminika tijekom intrauterinog razvoja.

U budućim istraživanjima trebalo bi uzeti u obzir nove laboratorijske tehnike koje nam mogu pružiti dodatan uvid u farmakokinetiku i mehanizam djelovanja lijekova. Primjer nove metode je „organ na čipu“ koji je koristan za istraživanje odnosa majke i fetusa, prijenosa tvari te djelovanja lijekova na fetus. Potrebna su i veća ulaganja u studije s lijekovima kako bi se trudnicama omogućila dostupnost ključnih informacija, a samim time, ukoliko je nužna, primjena određenih lijekova (54).

Uzimajući u obzir rezultate radova, kao i rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti da antihistaminici desloratadin i bilastin ne utječu štetno na razvoj jetre i slezene potomaka Sprague Dawley štakorica. U našem istraživanju pokazana je smanjena količina dvostrukih jezgara u hepatocita muških potomaka desloratadinom tretiranih štakorica iz čega proizlazi da su vjerojatno podložniji razvoju jetrenih tumora i imaju slabiji metabolizam u odnosu na ostale životinjske skupine, no to još treba dodatno istražiti.

Prije uzimanja bilo kojeg lijeka tijekom trudnoće, liječnik i pacijentica trebaju razgovarati o potencijalnom riziku odnosno koristi lijeka. Pacijentici treba objasniti da iako nije zabilježeno da su određeni teratogeni učinci povezani s unosom antihistaminika u trudnoći, poželjno je odgoditi upotrebu lijekova u prvom tromjesečju. Ukoliko je nužna primjena preporučuje se da se alergijske manifestacije liječe primjenom lijekova za lokalnu upotrebu poput blagih emolijenasa i lokalnih antihistaminika (38).

## 7. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

1. Primjena antihistaminika desloratadina i bilastina ne uzrokuje promjene u razvoju jetre i slezene kod potomaka trudnih Sprague Dawley štakorica.
2. U jetri ne dolazi do povećanja broja mastocita, a količina mitohondrija se ne razlikuje kod potomaka antihistaminicima tretiranih i netretiranih Sprague Dawley štakorica.
3. Uočena je statistički značajna razlika u količini dvostrukih jezgara hepatocita muških potomaka desloratadinom tretiranih štakorica.
4. U slezeni ne dolazi do promjene omjera crvene i bijele pulpe kao ni količine vezivnog tkiva kod potomaka antihistaminicima tretiranih i netretiranih Sprague Dawley štakorica.

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi:** Usporediti histološku građu jetre i slezene eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu. Usporediti broj mastocita i brojnost mitohondrija jetre te količinu vezivnog tkiva i omjer crvene i bijele pulpe u slezeni eksperimentalnih u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Nacrt studije:** Istraživanje je zamišljeno kao studija parova. U studiju su uključene tri skupine Sprague Dawley štakora, čije su majke od 10. gestacijskog dana trudnoće tretirane antihistaminicima desloratadinom ili bilastinom, odnosno nisu tretirane. Skupine su još podijeljene na muške i ženske potomke.

**Materijali i metode:** Tkivo jetre pripremljeno za analizu obojano je hemalaun i eozinom za prikaz histološke građe, Toluidinskim modrilom za prikaz mastocita te PTAH bojanjem za prikaz količine mitohondrija jetre. Za vizualizaciju tkiva slezene korišteni su hemalaun i eozin kojim smo prikazali omjer crvene i bijele pulpe te pikrosirijus bojanje kojim smo prikazali količinu vezivnog tkiva.

**Rezultati:** Postoji statistički značajna razlika u količini dvostrukih jezgara u hepatocitima kod muških potomaka Sprague Dawley štakorica tretiranih desloratadinom dok kod ženske skupine potomaka štakorica nema statistički značajne razlike. Brojnost mitohondrija i broj mastocita u jetri nije promijenjen kod potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom. Omjer crvene i bijele pulpe potomaka štakorica netretiranih i tretiranih antihistaminicima, kao i postotni udio retikulinskih vlakana ostaje nepromijenjen.

**Zaključak:** Primjena antihistaminika desloratadina i bilastina ne uzrokuje promjene u razvoju jetre i slezene potomaka trudnih Sprague Dawley štakorica. U jetri ne dolazi do povećanja broja mastocita, a u slezeni se ne mijenja omjer crvene i bijele pulpe.

**Ključne riječi:** antihistaminici; jetra; slezena; trudnoća.



## 9. SUMMARY

### **Effect of desloratadine and bilastine antihistamines on the development of the liver and spleen of Sprague Dawley rats**

**Objectives:** Compare the histological structure of a liver and a spleen of the experimental groups in relation to the control group. Compare the number of mast cells and the number of mitochondria in the liver and compare the amount of connective tissue and the ratio of red and white pulp in the following experimental groups versus the control group.

**Study Design:** This study was designed as a case-control study. The study included three groups of animals whose mothers, Sprague Dawley rats, had been treated with the antihistamines desloratadine or bilastine since the 10<sup>th</sup> gestational day of pregnancy or had not been treated. The groups were further divided into male and female offspring.

**Materials and methods:** Prepared liver tissue for analysis was stained with hemalaun and eosin to show histological structure, Toluidine blue to show mast cells and PTAH staining to show the amount of liver mitochondria. Hemalaun and eosin were used to visualize the spleen tissue, which was used to show the ratio of red and white pulp and picrosirius staining, which was used to show the amount of connective tissue.

**Results:** There is a statistically significant difference in the amount of double nuclei in hepatocytes in male Sprague Dawley rats' offspring treated with desloratadine while, in the female group of rats' offspring, no statistically significant difference is revealed. The numbers of mitochondria and mast cells in the liver were not altered in the rats' offspring untreated and treated with the antihistamines desloratadine and bilastine. The ratio of red and white pulp of rats' offspring untreated and treated with antihistamines, as well as the percentage of reticulin fibers in the visual field, remains unchanged.

**Conclusion:** The use of antihistamines desloratadine and bilastine does not cause changes in the development of the liver and spleen of the offspring of pregnant Sprague Dawley rats. There is no increase in the number of mast cells in the liver and the ratio of red and white pulp does not change in the spleen.

**Key words:** antihistamines; liver; spleen; pregnancy.

**10. LITERATURA**

1. Barbarić M, Šarčević B. Medicus in pregnancy. *Farmaceutski glasnik*. 2013;69(7): 439-452.
2. Bleyl S.B, Schoenwolf G.C. What is timeline of important events during pregnancy that may disrupted by a teratogenic exposure? 3 izdanje. USA: Teratology Primer;2020.
3. Kuvačić I, Kurjak A, Đelmiš J, i sur. *Porodništvo*. Zagreb: Medicinska naklada;2009.
4. *Endocrinology of Pregnancy*. Dostupno na adresi : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278962/>. Datum pristupa 7.4.2020.
5. *Breeding and Reproduction of Rats*. Dostupno na adresi : <https://www.msddvetmanual.com/all-other-pets/rats/breeding-and-reproduction-of-rats> Datum pristupa: 14.09.2020.
6. *Sprague Dawley Rat*. Dostupno na adresi: <https://www.taconic.com/pdfs/sprague-dawley-rat> Datum pristupa 14.09.2020.
7. Rijk E.P.C.T, Esch E, Filk G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol*. 2002;30(2):271-82.
8. Bonney E.A. Demystifying Animal Models of Adverse Pregnancy Outcomes: touching bench and bedside. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(6):567-584.
9. Milas V, Pušeljčić S, Dobrić H, Milas K. Utjecaj okolišnih čimbenika na perinatalni razvoj. *Med Vjesn*. 2015;47(1):00-00.
10. Junqueira L.C, Carneiro J. *Osnove histologije*. Prema 10. američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
11. R. V. Vora, R. Gupta, M. J. Mehta, A. H. Chaudhari, A. P. Pilani, and N. Patel. Pregnancy and Skin. *J Family Med Prim Care*. 2014; 3(4): 318–324.
12. Desforges M, Sibley CP. Placental nutrient supply and fetal growth, *Int J Dev Biol*. 2010: 377-90.
13. Francetić I. *Farmakoterapijski priručnik*. 7 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada;2015.
14. Walker R, Edwards C, Božikov V, Bačić-Vrca V. *Klinička farmacija i terapija*. Prema drugom engleskom izdanju. Zagreb: Školska knjiga;2004.
15. Zorn A.M. Liver development. *Division of Development Biology*. *Stem Journal*. 2019.
16. Tayeb K.S., Frederic P i sur. *Organogenesis and Development of the Liver*. *Development Cell*. USA. 2010.

17. Suchy F.J, Sokol R.F, Balistreri, W.F. Liver disease in children. 4 izdanje. Cambridge; 2014.
18. Sadler T.W. Lagmanova Medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga;2009.
19. Junqueira L.C, Carnerio J. Osnove histologije. Prema 10. američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga; 2005
20. Kapila V, Wehrle C.J, Tuma F. Physiology- Spleen. Stat Pearls. 2020.
21. Endo A, Ueno S, i sur. Morphogenesis of the spleen during the human embryonic period. The anatomical record: 2015;298:820-826.
22. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova Medicinska biokemija. 3 izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
23. Larson A.M. Drugs and liver. Metabolism and mechanisms of injury. Dostupno na: <http://www.uptodate.com/contents/drugsand-the-liver-metabolism-and-mechanisms-of-injury> Datum pristupa 27.7.2020
24. Sleisenger, Fordtran. Liver disease caused by drugs. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. 9th ed. Philadelphia, PA: Saunders;2010.
25. Lijekovima uzrokovano oštećenje jetre. Dostupno na adresi: [https://www.kardio.hr/2017/02/03/lijekovima-uzrokovano-ostecenje-jetre/?fbclid=IwAR0fN8I1zF8mKjaWCMH5ka8zQBuiDv5vyHwb8GiqNpw0ZHaE5bywn5\\_zGko](https://www.kardio.hr/2017/02/03/lijekovima-uzrokovano-ostecenje-jetre/?fbclid=IwAR0fN8I1zF8mKjaWCMH5ka8zQBuiDv5vyHwb8GiqNpw0ZHaE5bywn5_zGko) Datum pristupa 23.7.2020.
26. Li L, Duan M, Chen W, i sur. The spleen and liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. Journal of Translational Medicine. 2017;15:111.
27. Andreis I, Batinić D, Čulo F, i sur. Imunologija. 7 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
28. Cataldi M, Vigliotti C, i sur. Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and Exosomes. Int J Mol Sci. 2017;18(6):1249.
29. Role of the spleen in drug metabolism. Dostupno na adresi: <https://www.news-medical.net/health/Role-of-the-Spleen-in-Drug-Metabolism.aspx> Datum pristupa: 28.8.2020.
30. Li L, Duan M, Chen W, i sur. The spleen and liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. Journal of Translational Medicine. 2017;15:111.
31. Mekori Y.A. Introduction to Allergic Disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2009;36(S): S1-S18.
32. Gurish MF, Austen KF. The diverse role of mast cells. J Exp Med 2001; 94:1-5.

33. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine*. 2012;106:9-14.
34. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11 izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
35. Scaglione F. Safety profile of Bilastine: second generation h1-antihistamines. *Med and Pharmacol Sci*. 2012;16: 1999-2005.
36. Kolagenoze-bolesti vezivnog tkiva. Dostupno na adresi:  
.http://www.zzjzpgz.hr/nzl/29/tkivo.htm Datum pristupa: 24.07.2020.
37. Škrablin S. Why are collagenoses dangerous for pregnancy? *Reumatizam*. 2006;53:2
38. Kar S, Krishnan A, Mohankar A. A review of antihistamines used during pregnancy. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012;3(2): 105-108.
39. Shawky R.M, Seifeldin N.S. The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects. *Egyptian J. of Medical Human Genetics*. 2015: 287-290.
40. Desloratadin. Dostupno na adresi:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Desloratadine?fbclid=IwAR1wBmGg1EG4IS5-D6WKS8901YyrZ9z7BSkeNplWWp8oUxKHlbaWLJURtik> Datum pristupa 23.07.2020.
41. Desloratadin. Dostupno na adresi:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Desloratadine?fbclid=IwAR1wBmGg1EG4IS5-D6WKS8901YyrZ9z7BSkeNplWWp8oUxKHlbaWLJURtik> Datum pristupa 23.07.2020.
42. Ridolo E, Montagni M, Canonica G.W. Bilastine: new insight into antihistamine treatment. *Clin Mol Allergy*. 2015;13(1):1
43. Rueden C, Dietz C, Horn M, i sur. 2016. ImageJ Ops Software.
44. Andersson N.W, Poulsen H.E, Andersen J.T. Desloratadine Use During Pregnancy and Risk of Adverse Fetal Outcomes: A Nationwide Cohort Study. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(5):1598-1605.
45. Li Q, Mitchell A.A, Werler M.M, i sur. Antihistamine Use in Early Pregnancy and Risk of Birth Defects. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(6):666-74 e1.
46. Hammad S, Friebel A, i sur. Role of binucleated hepatocytes in hepatotoxicity and liver regeneration. *Archiv for Experimentall Pathology and Pharmakology*. 2014;387(S1):S46-S47

47. Kreutz C, MacNelly S, Follo M, i sur. Hepatocyte Ploidy Is a Diversity Factor for Liver Homeostasis. *Front. Physiol.* 2017.
48. Zhang S, Lin Y.H, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle.* 2019; 18(12): 1302-1315.
49. Esch I, Leurs R. Histamine receptors. *Tocris Reviews.* 2008;29:1-8.
50. Thangam E.B, Jemima E.A, Singh H, i sur. The Role of Histamine and Histamines Receptor sin Mast Cell-Mediated Allergy an Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front. Immunol.* 2018.
51. Andersson N.W, Poulsen H.E, Andersen J.T. Desloratadine Use During Pregnancy and Risk of Adverse Fetal Outcomes: A Nationwide Cohort Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(5):1598-1605.
52. Xie H i He SH. Roles of antihistamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2005;11(19):2851-2857.
53. Esposti D.D, Hamelin J, Bosselut N, i sur. Mitochondrial Roles and Cytoprotection in Chronic Liver Injury. *Biochemistry Research International.* 2012;1-16.
54. Stock S. JE, Norman J.E. Medicines in Pregnancy. *Journal List.* 2019;8.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Marina Putnik

Datum i mjesto rođenja:

5. rujna 1996., Osijek

Obrazovanje:

2018. – 2020. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija u Osijeku

2003. – 2011. Osnovna škola Dalj u Dalju