

Gustoća intraepidermalnih vlakana u Sprague Dawley štakora intrauterino tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom

Lulić, Doris

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:443520>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Doris Lulić

**GUSTOĆA INTRAEPIDERMALNIH
VLAKANA U SPRAGUE DAWLEY
ŠTAKORA INTRAUTERINO
TRETIRANIH ANTIHISTAMINICIMA
DESLORATADINOM I BILASTINOM**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Doris Lulić

**GUSTOĆA INTRAEPIDERMALNIH
VLAKANA U SPRAGUE DAWLEY
ŠTAKORA INTRAUTERINO
TRETIRANIH ANTIHISTAMINICIMA
DESLORATADINOM I BILASTINOM**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

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

Mentor rada: prof.dr.sc. Marija Heffer

Rad ima 36 listova, 1 tablicu i 4 slike.

ZAHVALA:

Ogromno hvala profesorici i mentorici Mariji Heffer koja mi je omogućila izradu ovog rada. Hvala vam što ste još jednom pristali biti mi mentorica i pustili me u labos da radim hehe. Stvarno ste zakon!

Posebno hvala Miloradu! Obi hvala ti što si još jednom bio uz mene i što si mi pomogao što god sam te pitala. Zovi kad god treba nešto raditi. :P

Hvala Vedrani što mi je dopustila sudjelovanje u projektu i odlazak u Szeged. Hvala ti na tom novom iskustvu! Puno si mi pomogla tamo!

Marta hvala ti na svim odgovorima kada sam te gnjavila oko razmjena i pitanja oko papira i kako to sve sastaviti.

Hvala Vam svima zajedno za to što ste me prihvatili u labos, što sam se uz vas uvijek osjećala dobrodošlo i hvala vam što ste uvijek govorili da niti jedno pitanje nije glupo (bilo ih je puno). Pokazali ste mi kako rad u labosu može i treba izgledati i kako tim koji se drži zajedno može sve.

Hvala i mojoj obitelji koja mi je omogućila studiranje i koji su mi bili velika potpora kroz sve! Brate hvala ti na brzom kompu :P Seko tebi hvala na bezuvjetnoj potpori!

Hvala i mom dečku Ivanu koji je još uvijek tu nakon 4 godine i koji uvijek sluša moje jadikovanje i brigu da neću stići na vrijeme.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Struktura kože i njena funkcija	1
1.1.1. Osjetna inervacija kože	1
1.2. Modulacija imunološkog odgovora živčanim sustavom	2
1.3. Histamin	4
1.3.1. Histaminski receptori	4
1.4. Antihistaminici	5
1.4.1. Desloratadin	6
1.4.2. Bilastin	6
1.5. Intrauterini razvoj osjetnih vlakana kože štakora	7
1.6. Trans placentarni transportni mehanizam	7
1.6.1. Placentarni ABC prijenosnici	8
1.7. Upotreba antihistaminika u trudnoći	8
2. HIPOTEZA	10
3. CILJEVI	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1. Ustroj studije	12
4.2. Pokusne životinje	12
4.3. Priprema tkiva za histološku i imunohistokemijsku analizu	13
4.4. Histološka analiza	14
4.5. Imunohistokemijska analiza	14
4.6. Izračun gustoće PGP 9.5 pozitivnih vlakana	15
4.7. Statističke metode	16
5. REZULTATI	17
5.1. Ekspresija PGP 9.5 epitopa u koži uške	17
5.2. Rezultati hematoksilin-eozin bojenja	21
6. RASPRAVA	22
7. ZALJUČAK	26
8. SAŽETAK	27
9. SUMMARY	28
10. LITERATURA	29
11. ŽIVOTOPIS	36

POPIS KRATICA:

ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
BF	skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom
BM	skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom
Ca ²⁺	ion kalcija
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CGRP	peptid povezan s kalcitoninskim genom (engl. <i>calcitonin gene-related peptide</i>)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>)
CS - CAIA	analiza slike subtrakcijom boje pomoću računala (engl. <i>colour subtractive-computer-assisted image analysis</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DF	skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratadinom
DM	skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratadinom
DRG	gangliji dorzalnih korjenova (engl. <i>dorsal root ganglia</i>)
ECM	izvanstanični matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
GIT	probavna cijev (engl. <i>gastrointestinal tract</i>)
HDC	histidin dekarboksilaza (engl. <i>histidine decarboxylase</i>)
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HNMT	histamin N-metil transferaza (engl. <i>histamine N-methyltransferase</i>)
HR	histaminski receptor (engl. <i>histamine receptor</i>)
IENF	intraepidermalna živčana vlakna (engl. <i>intraepidermal nerve fibers</i>)
IgE	imunoglobulin E (engl. <i>immunoglobulin E</i>)

KF	kontrolna skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane
KM	kontrolna skupina muških potokama Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane
MRP	proteini koji daju otpornost na lijekove (engl. <i>Multidrug resistant protein</i>)
NEP	neutralna endopeptidaza (engl. <i>neutral endopeptidase</i>)
NF-KB	inhibitori jezgrinog čimbenika kapa B (engl. <i>NF-kappa B inhibitors</i>)
NT	neurotransmiter (engl. <i>neurotransmitter</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PFA	paraformaldehid (engl. <i>paraformaldehyde</i>)
PGP 9.5	protein gen produkt 9.5 (engl. <i>protein gene product 9.5</i>)
P-gp	P-glikoprotein (engl. <i>P-glycoprotein</i>)
REM	brzi pokreti očima (engl. <i>rapid eye movement</i>)
SFN	neuropatija živčanih vlakana malog promjera (engl. <i>small fiber neuropathy</i>)
SK	tvar K (engl. <i>substance K</i>)
SP	tvar P (engl. <i>substance P</i>)
<i>tmHA</i>	telemetilhistamin (engl. <i>tele-methylhistamine</i>)
VIP	vazoaktivni intestinalni polipeptid (engl. <i>vasoactive intestinal peptide</i>)
VMAT2	vezikularni monoaminski prijenosnik (engl. <i>vesicular monoamine transporter</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

1. UVOD

1.1. Struktura kože i njena funkcija

Koža je jedan od najvećih ljudskih organa čija funkcija je višestuka, a primarna je zaštita organizma. Koža također sudjeluje u termoregulaciji, osjetni je organ, ima endokrinu funkciju, sudjeluje u neverbalnoj komunikaciji (1). Površina kože je 1,7 m² i teži oko 15 % tjelesne mase. Podijeljena je na slojeve: epidermis, dermis i subkutani sloj (2).

Epidermis je vanjski dio kože i se sastoji od velikog broja stanica. Oko 95 % stanica čine keratinociti, ostale stanice su melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice. Epidermis je sloj kože bez krvnih žila, a nutrijente dobiva iz kapilarnog spleta dermisa preko epidermalno-dermalnog spoja. Epidermalni slojevi su: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* i *stratum basale*. Donja dva sloja zajedno se još nazivaju *stratum germinativum* jer se u njima zbivaju diobe (3).

Dermis je vezivni sloj kože. Sastoji se od kolagenih i elastičnih vlakana te glikozaminoglikana koji se zajedno nazivaju izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM). Stanice dermisa su fibroblasti, dermalne dendritičke stanice, mastociti i histociti. U dermisu se još nalaze krvne i limfne žile te živci. Podijeljen je u gornji, papilarni dermis, i donji, retikularni dermis (4).

Subkutano tkivo leži ispod dermisa. Sastoji se od masnog i vezivnog tkiva kroz koje prolaze živci i krvne žile. Subkutano tkivo služi kao izolator, absorbira energiju udaraca i čuva toplinu (3).

1.1.1. Osjetna inervacija kože

Na osnovu strukture i neurofizioloških svojstava osjetna živčana vlakna kože se dijele u slijedeće skupine:

1. A α vlakna - promjera 12 - 22 μ m, dobro su mijelinizirana i imaju veliku brzinu provođenja potencijala 70 - 120 m/s (5);
2. A β vlakna - su nešto slabije mijelinizirana, promjera 6 - 12 μ m, provode proprioceptivne i mehaničke podražaje (6,7);

3. A δ vlakna - su slabo mijelizirana, nociceptivna vlakna, promjera 1 - 5 μm i srednje brzine provođenja podražaja 4 - 30 m/s. Većina A δ vlakana je polimodalna. Sudjeluju u nocicepciji i percepciji mehaničkog podražaja (8);
4. C vlakna - promjera 0,2 - 1,5 μm nisu mijelizirana i najsporije provode podražaj brzinom 0,5 - 2 m/s. Kao i A δ , C vlakna su polimodalna i također provode nociceptivne podražaje (9).

Intraepidermalna živčana vlakna (engl. *intraepidermal nerve fibers*, IENF) su slobodni živčani završetci distalnih aksona pseudounipolarnih stanica i najčešći su tip živčanih završetaka u koži (10). Uključuju različite tipove osjetnih vlakana: A δ i C vlakna. U epidermisu nalazimo samo C-vlakna, a C- i A δ -vlakna možemo naći skupa u subepidermalnom sloju. Većina živčanih vlakana se nalazi u srednjem sloju dermisa (11, 12).

Dermalna živčana vlakna su organizirana u snopove koji se nalaze odmah ispod epidermalno-dermalne granice i čine subepidermalni pleksus iz kojeg dio vlakana odlaze u epidermis. Živčana vlakna koja ostaju u u dermisu formiraju razgranate strukture s različitim stupnjem složenosti. IENF funkcioniraju kao polimodalni receptori. Gustoća živčanih vlakana u koži je različita. Leđa imaju veću gustoću vlakana od udova. Vlakna u prstima i dlanovima se manje granaju od onih u ostalim djelovima kože (13, 14). Većina osjetnih vlakana koja polaze iz ganglija dorzalnih korjenova (engl. *dorsal root ganglia*, DRG) su A δ i C vlakna (5).

Podskupina C vlakana može prenositi osjet svrbeži koji je induciran histaminom. Mehanoosjetljiva C vlakna eksprimiraju histaminski receptor 1 (engl. *histamine receptor*, HR) i prenose osjet svrbeži, a nalaze se kao slobodni živčani završetci u epidermisu i time su najdostupniji potencijalnom djelovanju antihistaminika u amnijskoj tekućini. Peptidinergična C vlakna završavaju u *stratum spinosum*, dok nepeptidinergična C vlakna penetriraju u *stratum granulosum*. Predstavljaju najdistalnije nociceptore i zato su idealan kandidat za istraživanje gustoće intraepidermalnih vlakana na štakorima čije su majke tijekom intrauterinog razvoja tretirane antihistaminicima (15 - 18).

1.2. Modulacija imunološkog odgovora živčanim sustavom

Neuropeptidi i proinflamatorne molekule koje otpuštaju osjetni neuroni u koži mogu aktivirati specifične stanice i inducirati upalu na periferiji (23, 24). Glavna uloga neuropeptida je neurotransmitterska (engl. *neurotransmitter*, NT), ali imaju ulogu i u upali. Neuropeptide i

njihove receptore pronalazimo u većem broju u upaljenom tkivu. Neki od neuropeptida koji sudjeluju u procesu upale su: tvar P (engl. *substance P*, SP), peptid povezan s kalcitonininskim genom (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP), vazoaktivni intestinalni peptid (engl. *vasoactive intestinal peptide*, VIP) i tvar K (engl. *substance K*, SK). Proinflammatorna interakcija između neurona i ciljanih stanica je objašnjena kao aksonalno-refleksni model neurogenične upale (25). Kada dođe do ozljede tkiva koje je inervirano osjetnim neuronima, dolazi do provođenja ortodromičnog signala kroz osjetne neurone do DRG i onda u središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*, CNS). Osim ovakvog, klasičnog, načina provođenja signala kojim percipiramo bol, osjetni neuroni su sposobni provoditi sekundari impuls u obrnutom smjeru, natrag u inervirano tkivo – antidromični odgovor. Kod antidromičnog odgovora neuropeptidi se otpuštaju u ozlijeđeno tkivo i dolaze u interakciju sa stanicama koje se nalaze neposredno uz pobuđeni neuron (26, 27). Također je dokazano da ne-živčane stanice imaju receptore za neuropeptide otpuštene iz pobuđenih neurona. Stanice imunološkog sustava, epidermalne i dermalne stanice imaju receptore za NT (28 - 30).

Uz neuropeptide važnu ulogu u neurogenoj upali ima neutralna endopeptidaza (engl. *neutral endopeptidase*, NEP). NEP je glavna proteaza neurokinina i ima važnu ulogu u zaustavljanju neurogene upale. Uspješno se natječe s receptorom za otpuštene neuropeptide nakon antidromičnog odgovora. NEP se može pronaći na epidermisu i mikrovaskularnim endotelnim stanicama dermisa (31).

Većina osjetnih neuropatija, uključujući one povezane sa virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV) i dijabetes melitusom, su karakterizirane predominantno simptomima na periferiji i aksonalnom degeneracijom kožnih osjetnih živaca (32, 33). Neuropatije živčanih vlakana malog promjera (engl. *Small Fiber Neuropathy*, SFN) su neuropatije karakterizirane poremećajem A δ i C vlakana (34). Gubitak intraepidermalnih vlakana se smatra dijagnostičkim markerom SFN-ova. Glavni simptom SFN-ova je neuropatska bol (35).

Određivanje uzroka simptoma koji nastaju zbog promjena u osjetim vlaknima može biti problem. Kada se sumnja na neuropatiju, ispitivanje neurona i provodljivosti neurona uglavnom ne otkrivaju abnormalnosti. Stoga je bilo potrebno razviti način kojim će se SFN moći pouzdano odrediti. Određivanje gustoće intraepidermalnih živčanih vlakana se pokazao kao vrlo važan alat u detekciji SFN-a zbog mogućnosti predviđanja degradacije osjetnih neurona usprkos normalnoj morfometriji promatranog živca (36). Gustoća intraepidermalnih vlakana korelira sa neurofiziološkim promjenama, prisutnošću i ozbiljnosti bolesti (37 - 39).

1.3. Histamin

Histamin je bioaktivni monoamin koji se ponaša kao signalna molekula i NT (40). Histamin na periferiji regulira imunski odgovor. Također, sudjeluje u regulaciji svrbeži kada ga luče mastociti i bazofili kože gdje aktivira H receptor pozitivna C vlakana. Glavna funkcija histamina u mozgu je poticanje buđenja i supresija REM (engl. *rapid eye movement*) faze spavanja koju karakteriziraju brzi pokreti očima. U mozgu je jedini izvor histamina tuberomamilarna jezgra (engl. *tuberomammillary nucleus*, TMN) (41). Histamin aktivira primarna aferentna vlakna i dobro je poznat kao pruritogenični i/ili algeziogenični medijator. Na periferiji mastociti sadrže granule bogate histaminom koje se otpuštaju nakon aktivacije stanice s imunoglobulinom E (engl. *immunoglobulin E*, IgE). Histamin se veže na HR1 i HR2 receptore na nociceptivnim neuronima što dovodi do povećanja izražaja Nav 1.8 kanala i izaziva pojačanju osjetljivost na mehaničke i toplinske podražaje (42, 43).

Histidin dekarboksilaza (engl. *histidine decarboxylase*, HDC) pretvara aminokiselinu histidin u histamin koji se onda pakira u sinaptičke vezikule putem vezikularnog monoamin transportera (engl. *vesicular monoamine transporter*, VMAT2) (44). Kada su živčane stanice depolarizirane, histamin se otpušta u sinaptičku pukotinu i veže se na histaminske receptore koji se nalaze pre- ili postsinaptički. Za razliku od drugih monoaminergičkih NT, kao što su serotonin i dopamin, nema povratka histamina u presinaptičke neurone. Većina histamina se uklanja iz izvanstaničnog prostora pretvaranjem u inaktivni telemetilhistamin (engl. *telemethylhistamine*, tmHA) uz pomoć histamin N-metil transferaze (engl. *histamine N-methyltransferase*, HNMT) (45).

1.3.1. Histaminski receptori

Histamin djeluje putem 4 tipa H receptora koji su transmembranski proteini stanične membrane povezani s G-proteinima. Porodicu H receptora čine: HR1, HR2, HR3 i HR4. Zbog svog pleotropnog učinka, ovi receptori imaju mnoge kliničke učinke. Općenito govoreći H receptori su proteini s 7 transmembranskih domena povezani s G proteinom. Aktivacijom HR1 i HR2 receptora iducira se mobilizacija iona kalcija (Ca^{2+}) i akumulacija cikličkog adenozin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) (46).

C vlakna imaju HR1 receptor što ih čini podložnima utjecaju histamina. H1 receptor je široko rasprostranjen u organizmu. Dobro istražena je njegova prisutnost u CNS-u, glatkim mišićima, osjetnim neuronima, srcu, srži nadbubrežne žlijezde, imunološkim, endotelnim i epitelnim stanicama. Posreduje u većini postsinaptičkih učinaka histamina na CNS. Aktivacija HR1 receptora depolarizira postsinaptičke neurone, što je ključno u promociji buđenja. Vezanjem na HR1 receptor histamin stimulira kontrakciju glatkih mišića u respiratornom i gastrointestinalnom traktu, stimulira kihanje i povećava permeabilnost krvnih žila što vodi do edema. Zbog široke rasprostranjenosti HR1 receptori su uključeni u razvoj bolesti kao što su alergijski rinitis, atopijski dermatitis, konjuktivitis i urtikarija (47).

HR2 receptore možemo pronaći u mukoznim stanicama probavne cijevi (engl. *gastrointestinal tract*, GIT), srca, CNS-a, stanicama imunološkog sustava i stanicama glatkih mišića u plućima, krvnim žilama i maternici. Aktivacija HR2 receptora vodi ka aktivaciji cAMP ovisnog i neovisnog puta (48). Različita ekspresija u tijelu rezultira: stimulacijom sekrecije klorovodične kiseline u želucu, opuštanjem glatkih mišića žila i pluća, povećanom srčanom aktivnošću i povećanom kontraktilnosti. Također posjeduju imunomodulatorni efekt putem supresije bazofila. HR2 receptori sudjeluju i u supresiji Th1 i Th2 odgovora (49, 50).

1.4. Antihistaminici

Antihistaminici su grupa lijekova koji posjeduju sposobnost inhibicije brojnih histaminskih učinaka. Spojevi koji se koriste kao antihistaminici uglavnom su kompetitivni inhibitori aktivnosti histamina. Dijele se na inhibitore HR1 i HR2 receptora (51, 52).

Biodostupnost antihistaminika je regulirana količinom transportera u crijevima. Taj transporter je P-glikoprotein (engl. *P-glycoprotein*, P-gp). P-gp je crpka koja se nalazi na epitelnim stanicama (53). Podaci prikupljeni istraživanjima na glodavcima govore o tome da antihistaminici, koji se ponašaju kao supstrat za P-gp crpku, pokazuju malo utjecaja na CNS što se povezuje sa činjenicom da P-gp pumpa antihistaminike iz CNS-a. Važnost P-gp-a u tom kontekstu je potvrđena posebno za drugu generaciju antihistaminika kao što su bilastin i desloratadin, koji jesu supstrati za P-gp (54).

Druga generacija antihistaminika uključuje lijekove kao što su loratadin, cetirizin, desloratadin i bilastin. Pokazuju visoku selektivnost za HR1 receptor, što vodi do gotovo nezamjetnog kolinergičkog, adrenergičkog i serotninnergičkog učinka. Imaju visok terapijski

indeks i nemaju sedacijski učinak. Dugodjelujući su i slabo lipofilni, što rezultira njihovim neprolaskom u CNS. Nuspojave koje mogu uzrokovati su fotosenzitivnost, tahikardija i prolongacija QT intervala (55 - 57).

1.4.1. Desloratadin

Desloratadin je aktivni metabolit loratadina, nastao metabolizmom loratadina u hepatičnom citokrom P450 sustavu (58). Nakon oralne primjene vrijeme postizanja učinka je 75-180 minuta, a trajanje učinka je 24 sata. Od svih lijekova iz sekundarne generacije antihistaminika, desloratadin ima najveći afinitet vezanja na H1 receptor (59). Desloratadin ne inducira nikakve antimuskarinske učinke u terapijskoj dozi. Također nema interakcije s kalijevim kanalima u srcu, ne utječe na kognitivne funkcije i psihomotorni rad te ne potencionira učinke alkohola (etanola), a nije primjećen ni sedacijski učinak (60). Studije teratogenosti, provedene na štakorima i zečevima, nisu pokazale teratogeni učinak desloratadina. Oralne doze primjenjene u tim studijama su 75-150 puta veće od maksimalne preporučene dnevne doze za čovjeka (mg/m^2). U prospektivnoj studiji, koja je promatrala 16 novorođenčadi majki koje su tretirane loratadinom u prvom tromjesječju, nisu primjećene kongenitalne anomalije (61). Novijim studijama je isključena mogućnost da desloratadin predstavlja veliki teratogeni rizik (62).

1.4.2. Bilastin

Bilastin je novi inverzni agonist HR1 receptora. Pripada u istu nesedativirajuću obitelj kao i desloratadin. *In vitro* studije su pokazale da ima visoku specifičnost za H1 receptor i vrlo nizak afinitet na druge testirane receptore. Učinkovitost mu je usporediva s onim kod desloratadina. Osim antagonizma HR1 receptora također je pokazao i protuupalni učinak. *In vivo* studije na štakorima su pokazale značajnu redukciju u aktivaciji histaminom posredovane endotelne permeabilnosti, mikrovaskularna ekstrasvazacije i inhibicije kontrakcije glatkih mišića i bronhospazma. Bilastin nema učinak na citokrom P450 sustav enzima u jetri i nema dokaza o interakciji s drugim lijekovima. Distribucija u mozgu je nedetektibilna. Svoj učinak postiže 30-60 minuta nakon primjene, a učinak traje 24 sata. Bilastin nije povezan sa onkogenom aktivnošću. Također nije pokazao utjecaj na prenatalni i postnatalni razvoj. Nije pokazao toksični utjecaj na embrij kada su majke štakorice tretirane bilastinom gavažom (63 - 65).

1.5. Intrauterini razvoj osjetnih vlakana kože štakora

Individualni neuroni u koži mogu se vizualizirati 14. gestacijskog dana razvoja štakora (koji traje 19 dana) distalno od lumbosakralnog pleksusa. Između 14.5. i 15. dana distalni aksoni se nalaze u aksilarnim i proksimalnim dijelovima kože stražnjih šapica i većina vlakana je vidljiva u epidermisu. Kada vlakna prođu u epidermis brzo se granaju kroz okolnu kožu. Vlakna do kraja 17. dana dolaze do vrhova šapa. Inicijalni dermatoni, 14. - 15. dana, u proksimalnom udru su još nepovezani s drugim neuronom puta, a između dermatoma postoje praznine. 16. dana dolazi do povećanja u gustoći inervacije kože. Prostori između dermatoma se popunjavaju i mogu se uočiti područja preklapanja između dermatoma (86 - 88). Kada su razvijene metode višestrukog označavanja dorzalnog i ventralnog roga kralježnične moždine, istih spinalnih segmenata, omogućena je identifikacija individualnih kožnih i mišićnih snopova neurona vrlo rano u razvoju embrija, od 14. dana (66, 67).

1.6. Transplacentalni transportni mehanizam

Molekule se iz majčine cirkulacije prenose na 3 načina: u slobodnom obliku otopljene u plazmi, vezane na transportne proteine ili vezane za eritrocite (68, 69). Kako bi molekule prošle kroz placentu barijeru moraju prijeći iz majčine krvi kroz stanice sincitiotrofoblasta u krv djeteta. Brzina prolaska kroz placentu ovisi o razini otopljenih tvari u odjeljcima (70, 71). Intenzitet prolaska lijeka kroz placentalnu barijeru ovisi o fizikalnim svojstvima lijeka kao što su:

1. Liposolubilnost – bolje prolazi lijek koji je topljiviji u mastima;
2. Stupanj ionizacije – ioniziraniji lijek slabije prolazi kroz placentalnu barijeru, mala količina neioniziranog lijeka je vrlo liposolubilna;
3. Veličina molekule – lijekovi male molekularne težine, ispod 500 daltona, dobro prolaze kroz placentalnu barijeru, dok oni iznad 1000 daltona prolaze teško.

Osim placentalne, lijekovi prolaze i krvno-moždanu barijeru fetusa. Istaživanje placentalne i krvno-moždane barijere u budućnosti može biti od velike koristi kako bi otkrili lijekove koji mogu djelovati ciljano na fetus (65).

1.6.1. Placentalni ABC prijenosnici

Trofoblast je mjesto izmjene između majčine i fetalne cirkulacije. Trofoblast obiluje ABC (engl. *ATP binding cassette*, ABC) prijenosnicima. Primjer takvih prijenosnika su P-gp te proteini koji daju otpornost na lijekove (engl. *multidrug resistant protein*, MRP). MRP mogu sniziti koncentraciju lijeka putem efluksnog mehanizma. P-gp je prisutan na apikalnoj strani membrane trofoblata i transportira svoje supstrate u izvanstanični prostor. Tolerancija fetusa će biti veća na lijek koji je ujedno P-gp supstrat (72).

1.7. Upotreba antihistaminika u trudnoći

Lijekovi se u trudnoći prepisuju samo kada je potencijalna korist veća od potencijalnog rizika. Poseban rizik nosi uporaba lijekova tokom prvog tromjesečja. Uporaba lijekova u tom razdoblju može rezultirati ozbiljnim strukturalnim fetalnim malformacijama, a uporaba dalje u trudnoći može rezultirati različitim funkcionalnim defektima ili poremećajima rasta. Antihistaminici su jedni od najčešće prepisivanih lijekova tijekom trudnoće, koriste se kao antipruritički ili antiemetički lijekovi (73).

Alergije su česte kod žena reproduktivne dobi, pogađaju 20-30 % žena reproduktivne dobi, isti broj je i tijekom trudnoće (74). Ovo ih čini najčešćim medicinskim stanjem koje može komplicirati trudnoću. Nadalje, kod 10-30 % žena koje su imale postojeće alergije prije trudnoće došlo je do češće pojave ili pogoršanja simptoma tijekom trudnoće. Takva pojava se može objasniti povećanim volumenom krvi, proširenjem krvnih žila nosa te povećanom sekrecijom iz nosa zbog utjecaja hormona. Svrbež je jedan od najčešćih dermatoloških simptoma tokom trudnoće (75). Osim površinskih kožnih bolesti različite sistemske bolesti kao simptom mogu imati svrbež (76).

Približno 60 % žena kao simptom tijekom prvog tromjesečja trudnoće imaju mučninu i povraćanje i pola od toga broja je tretirano antihistaminicima kako bi suzbili simptome. Kako bi promijenili kut gledanja predloženo je da antihistaminici mogu imati protektivnu ulogu. Jako povraćanje i mučnina mogu oslabiti majku i ponekada ugroziti njen život. Može doći do suboptimalne nutriticije majke, koja kombinirana s dehidracijom i elektrolitskim disbalansom rezultira ozbiljnim povraćanjem (engl. *hyperemesis gravidarum*) što stvara suboptimalne uvijete za razvoj fetusa. Animalne studije su pokazale da malnutricija majke tijekom gestacije

rezultira povećanim rizikom od malformacija fetusa. Kod ljudi je hiperemeza povezana sa povećanim rizikom malformacije CNS-a ili malformacije uha i oka (77).

Niti jedan od dostupnih antihistaminika nije kategoriziran kao siguran za korištenje tijekom trudnoće jer nema dovoljno eksperimentalnih studija. Eksperimentalne studije na ljudima koje bi mogle dokazati da su antihistaminici sigurni je teško provesti i neetički jer bi se trudnice nepotrebno izlagalo lijekovima za koje je nedovoljno poznat omjer koristi i rizika. Upravo zbog tog razloga većina podataka je prikupljena promatranjem. Preporučeno je da izbor specifičnog lijeka koji će se koristiti tijekom trudnoće treba biti temeljen na dostupnim opažajnim podacima, podacima prikupljenim tijekom animalnih studija i prema tome koliko je dugo lijek u kliničkoj primjeni (78).

Prva generacija antihistaminika se preferira zbog duže prisutnosti u kliničkoj primjeni. Većina antihistaminika prve generacije, koristi se kao tretman za mučninu i povraćanje. Niti jedan od navedenih lijekova, prema provedenim studijama, ne povećava rizik za razvoj fetusa. Epidemiološki podaci podupiru tvrdnju da su sigurni za korištenje tijekom rane trudnoće (79). Meta-analize koje su obuhvatile više od 200 000 sudionika zaključuju da nema povećanog rizika od bilo kojeg oblika kongenitalnih malformacija (80).

Druga generacija antihistaminika ima prednost pred prvom generacijom zbog toga što ne uzrokuju sedaciju i antikolinergičke posljedice. Animalne studije provedene na loratadinu i cetirizinu su obećavajuće, ali broj trudnica izložen njihovom utjecaju još uvijek nije dovoljno velik da bi se izvukli konačni zaključci. Izloženost drugoj generaciji antihistaminika tijekom organogeneze bi se trebalo izbjegavati osim kada je pozitivan učinak lijeka puno veći od rizika (81, 82).

Ako je moguće, svrbež i druge alergijske manifestacije bi se trebale liječiti topikalno tijekom prvog tromjesječja. Ako se antihistaminici moraju prepisati onda se preporučuju antihistaminici prve generacije kao prvi izbor iako imaju više simptoma za majku. Pacijentima se također preporučuje da piju puno vode tijekom uzimanja antihistaminika prve generacije kako bi prebrodile antikolinergičku nuspojavu. Također moraju se odmah javiti ginekologu ako primjete bilo kakvu promjenu u kretanju ploda ili kontrakcijama nakon uzimanja lijeka. Ako se druga generacija antihistaminika treba koristiti, onda se kao lijek izbora preporučuju loratadin i cetirizin jer su najbolje istraženi do sada i nije pronađen teratogeni učinak. Antihistaminike druge generacije se preporučuje uzimati nakon prvog tromjesječja jer se tada odvija organogeneza (83, 84).

2. HIPOTEZA

Antihistaminici desloratadin i bilastin utječu na razvoj H1-pozitivnih intraepidermalnih živčanih završetaka štakora te dovode do promjene njihove gustoće u koži potomaka majki koje su tijekom trudnoće tretirane antihistaminicima.

3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

1. koristeći hemalaun-eozin histološko bojenje tkiva prikazati morfološke karakteristike tkiva uške eksperimentalnih skupina štakora (potomci tretiranih majki) u odnosu na kontrolnu skupinu (potomci netretiranih majki), starosti 3 mjeseca;
2. pomoću imunokemijskog bojenja tkiva na specifičan marker C i A δ vlakana, protein produkt gena 9.5 (PGP9.5), usporediti gustoću intraepidermalnih vlakana po mm² poprečnog presjeka uške, u životinja eksperimentalnih skupina s kontrolnom skupinom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je zamišljeno kao studija parova. U studiju su uključene tri skupine životinja čije su majke, Sprague Dawley štakorice, od 10. gestacijskog dana trudnoće tretirane antihistaminicima desloratidinom ili bilastinom, odnosno nisu tretirane.

Studija je načinjena na arhivi tkiva prikupljenog u sklopu RECOOP projekta „Farmakokinetička studija uticaja antihistaminskih lijekova na potomke štakorica koje su tijekom trudnoće tretirane antihistaminicima i procjena njihovog utjecaja na razvoj mozga“ voditeljice Vedrane Ivić. Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta u Szegedu (broj odobrenja IV/3796/2015).

4.2. Pokusne životinje

U studiju je uključeno ukupno 36 životinja starosti 3 mjeseca, podijeljenih u tri skupine (u svakoj 6 mužjaka i 6 ženki):

1. potomci netretiranih Sprague Dawley štakorica;
2. potomci Sprague Dawley štakorica tretiranih desloratidinom;
3. potomci Sprague Dawley štakorica tretiranih bilastinom.

Studija je sadržavala ukupno 6 skupina životinja kako slijedi: kontrolna skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane (KM), kontrolna skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane (KF), skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom (BM), skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom (BF), skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratidinom (DM), skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratidinom (DF).

Trudne ženke su od 10. gestacijskog dana tretirane antihistaminicima u dozi od 10 mg/kg, pripremljenima u 0,25 %-tnoj otopini metil-celuloze. Lijekovi su primjenjeni putem gavaže. Nakon toga je nasumice među potomcima odabrano 6 mušjaka i 6 ženki koje su činile eksperimentalnu skupinu, a koje su ostavljene bez ikakvog dodatnog tretmana do navršene starosti od 3 mjeseca. Kad su navršile propisanu dob sve životinje su uspavane smrtonosnom dozom izoflurana (Forane® isofluranum, Abbott laboratories LTD; Lake Bluff, IL, USA), a zatim žrtvovane dekapitacijom koristeći giljotinu za laboratorijske štakore.

Studija na životinjama i sakupljanje tkiva provedeno je na Sveučilištu u Szegedu (Farmaceutski fakultet, Odjel za farmakodinamiku i biofarmaciju, Szeged, Mađarska).

Nakon što su štakori dosegli 3 mjeseca starosti žrtvovani su od strane za to obučenih djelatnika s Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, uz poštovanje svih etičkih načela određenima u Zakonu o zaštiti životinja Republike Hrvatske. Studija na prikupljenim tkivima u svrhu izrade ovog diplomskog rada odobrena je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/20-08/07, Broj: 2158-61-07-20-40, Datum: 15.5.2020.).

4.3. Priprema tkiva za histološku i imunohistokemijsku analizu

Izolirana tkiva uški fiksirana su u 4 %-tnom paraformaldehidu (engl. *paraformaldehyde*, PFA) 24 sata, zatim su prebačena u 1x fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) i uklopljena u 12 %-tnu želatinu. Uklapano je na način da je otopina želatine izlivena u jažice do polovice volumena jažice. U jažice su zatim smještene uške koje su prethodno kratko uronjene u želatinu. Zatim su uzorci potpuno prekriveni želatinom te stavljeni u hladnjak na +4°C tijekom noći. Nakon želatinizacije je slijedilo smrzavanje u tekućem dušiku te pohranjivanje u hladnjak na -80 °C do postupka rezanja na kriostatu. Uzorci su dodatno uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue freezing medium; Leica, Nussloch, Germany) te izrezani na kriostatu (Leica, CM3050S, Wetzlar, Njemačka) na debljinu od 18 µm pri temperaturi -18°C. Rezovi su tokom rezanja prikupljeni direktno na predmetna stakalca koja su prethodno želatinirana. Prije histološkog i imunohistokemijskog bojenja rezovi su stavljeni u 2 %-tnu otopinu PFA tokom 30 minuta.

4.4. Histološka analiza

Svrha ove analize je prikaz histološke strukture kože uške uštakora što je napravljeno hematoksilin-eozin bojenjem.

Nakon postupka do-fiksiranja 2 %-tnom otopinom PFA kroz 30 min rezovi su isprani u destiliranoj vodi (10 minuta). Zatim je učinjena rehidracija uranjanjem u 96 %-tni i 70 %-tni etilni alkohol i destiliranu vodu (svaki korak kroz 10 minuta). Nakon rehidracije preparati su obojeni hematoksilinom (10 min) i kratko isprani (1 minutu) u destiliranoj vodi. Višak hematoksilina ispran je vodovodnom vodom (10 min) nakon čega su preparati obojeni eozinom (3 min). Višak eozina ispran je zakiseljenim 96 %-tnim etilnim alkoholom (10 min). Rezovi su dehidrirani 100 %-tnim alkoholom (10 minuta) i opetovanim uranjanjem u ksilen (2 puta po 5 minuta) kako bi smo ih mogli pokriti biomount medijem (BioGnost Ltd., Zagreb, Medjugorska 59) i pokrovnicom. Obojeni uzorci slikani su kamerom Olympus D70 na mikroskopu Carl Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju okulara i objektiva 100x te kvantificirani u računalnom programu Fiji (85).

4.5. Imunohistokemijska analiza

Svrha ove analize bila je utvrditi broj PGP 9.5 pozitivnih neurona i kvantifikacijom odrediti gustoću intraepidermalnih vlakana na mm² uške.

Nakon do-fiksacije u 2 %-tnoj otopini PFA, rezovi su prebačeni u citratni pufer kako bi se načinio oporavak epitopa. Korak oporavka sastojao se u kuhanju preparata u citratnom puferu tijekom 1 sata na 95°C. Nakon ovog postupka rezovi su ostavljeni da se postepeno ohlade. Ohlađeni rezovi prebačeni su u PBS i ispirani kroz 10 minuta. Aktivnost endogenih peroksidaza uklonjena je inkubacijom u 1 %-tnoj otopini H₂O₂ (Kemika, Zagreb) u PBS-u. Ovaj korak je napravljen dva puta u trajanju od 20 minuta na +4°C u vlažnoj komori jer se pokazalo kako uške imaju visoku aktivnost endogenih peroksidaza. Kako bismo spriječili nespecifično vezanje protutijela rezove smo inkubirali 2 sata u otopini za blokiranje koja se sastojala od kozjeg seruma u volumnom udjelu od 5 % i albumina iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u volumnom udjelu od 1 % (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) te 1 % detergenta Triton (Acros Organics, lot: A0341006) koji je dodan radi permeabilizacije uzoraka. Nakon inkubacije u otopini za blokiranje rezovi su isprani u PBS-u 3 puta po 10 minuta. Primarno

protutijelo anti-PGP 9.5 (Abcam, Cambridge, lot:15503) je pripravljeno u otopini za blokiranje (bez dodatka detergenta) u razrijeđenju 1:500. Rezovi su inkubirani u primarnom protutijelu preko noći na +4°C. Primarno protutijelo je isprano u PBS-u (tri puta tokom 10 minuta) kako bi se uklonio višak primarnih protutijela koja se nisu vezala na epitop. Rezovi su zatim inkubirani u otopini kozjeg anti-zečjeg IgG sekundarnog protutijela konjugiranog enzimom peroksidaze iz hrena (Jackson immuno research, Cambridgeshire, Velika Britanija, JIL: 111-035-144). Protutijelo je razrijeđeno u omjeru 1:500 s otopinom za blokiranje. Inkubacija sa sekundarnim protutijelom trajala je 4 sata na +4°C u vlažnoj komori, a zatim je uslijedilo ispiranje u PBS-u (3 puta po 10 minuta). Vizualizacija imunokemijske reakcije načinjena je supstratom za peroksidazu iz hrena koja se nalazi u "Roti®-DAB Kit"-u (Roth, Carl Roth GmbH + Co.KG, Charge:269285784). Supstrat je pripremljen prema uputama proizvođača, a korak vizualizacije trajao je 3 minute. Nakon vizualizacije razvijanje reakcije je prekinuto uranjanjem preparata u destiliranu vodu kroz 10 minuta. Preparati su ostavljeni da se osuše te zatim pokriveni biomount medijem (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska). Imunohistokemijska reakcija je slikana kamerom Olympus D70 na mikroskopu Carl Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju okulara i objektivna 100x te je kvantificirana u računalnom programu Fiji (85).

4.6. Izračun gustoće PGP 9.5 pozitivnih vlakana

Nakon što su preparati fotografirani kamerom, rađen je izračun gustoće vlakana u Fiji programu. Na svakoj fotografiji je najprije izmjerena površina uške pomoću alata dostupnih u Fiji programu. Kako je površina uške pomoću programa izmjerena u pikselima, bilo je potrebno površinu pretvoriti u μm^2 zatim u mm^2 . Prema skali i veličini slike izračunato je da je 2.408 pisela je jednako $1\mu\text{m}$. Zatim je ručno brojao broj PGP 9.5 pozitivnih vlakana po fotografiji. Nakon što su podaci o površini uške i broju 9.5 pozitivnih vlakana prikupljeni, za svaku fotografiju je izračunata gustoća vlakana. Gustoća je izračunata dijeljenjem broja pozitivnih PGP 9.5 pozitivnih vlakana sa površinom uške u mm^2 za svaku fotografiju.

4.7. Statističke metode

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu distribuciju, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Kako bi se utvrdile razlike u ekspresiji PGP 9.5 pozitivnih vlakana u skupinama štakora tretiranih antihistaminicima desloratadinom i bilastinom te onih netretiranih u slučaju normalne raspodjele podaci su analizirani ANOVA testom, a u slučaju nepravilne raspodjele korišteni su Mann-Whitney U test ili Kruskal-Wallis test. Dvosmjerni ANOVA test je također korišten kako bi se utvrdilo postoji li utjecaj antihistaminika i spola kao 2 različita čimbenika na gustoću PGP 9.5 pozitivnih vlakana te postoji li sinergizam ta dva čimbenika. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica12 (Tibco software, Paolo Alto, USA).

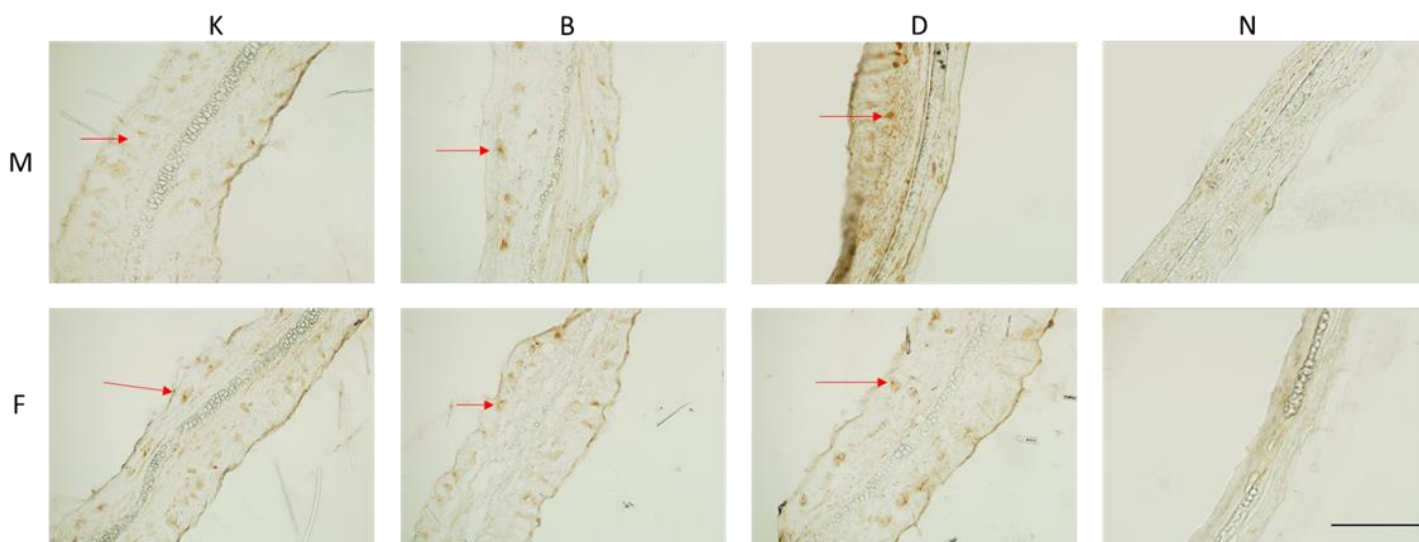
5. REZULTATI

5.1. Ekspresija PGP 9.5 epitopa u koži uške

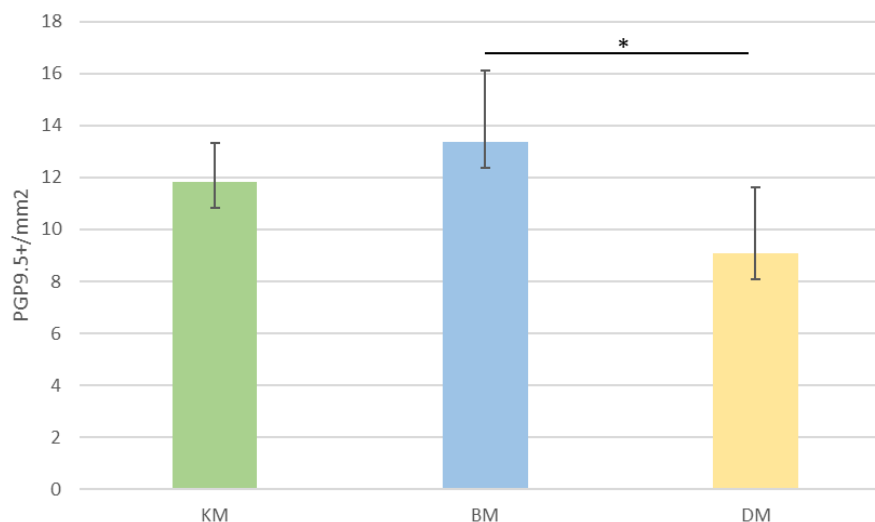
Slika 1. predstavlja skup fotografija po skupinama na kojima je vidljiva pozitivna imunohistokemija reakcija na marker PGP 9.5. Fotografije prikazuju i negativne kontrole u kojima reakcija nije vidljiva. Strelice su primjer nekih pozitivnih vlakna. Pozitivne reakcije su brojane i korištene u izračunu gustoće intraepidermalnih vlakana.

Ekspresija PGP 9.5, koji je marker mijeliziranih i ne mijeliziranih neurona, slijedi normalnu distribuciju kod uspoređivanih muških grupa životinja DM i BM. Niti jedna od dvije eksperimentalne skupine muških potomaka antihistaminicima tretiranih ženki statistički ne odstupa značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom muških potomaka antihistaminicima netretiranih ženki. Statistički značajno sniženu ekspresiju nalazimo kod DM skupine u odnosu na BM skupinu ($P = 0,019$), ANOVA test. Slika 2. je grafički prikaz rezultata muških skupina. Slika 3. prikazuje ženske skupine. Kod ženskih skupina nema statistički značajne razlike.

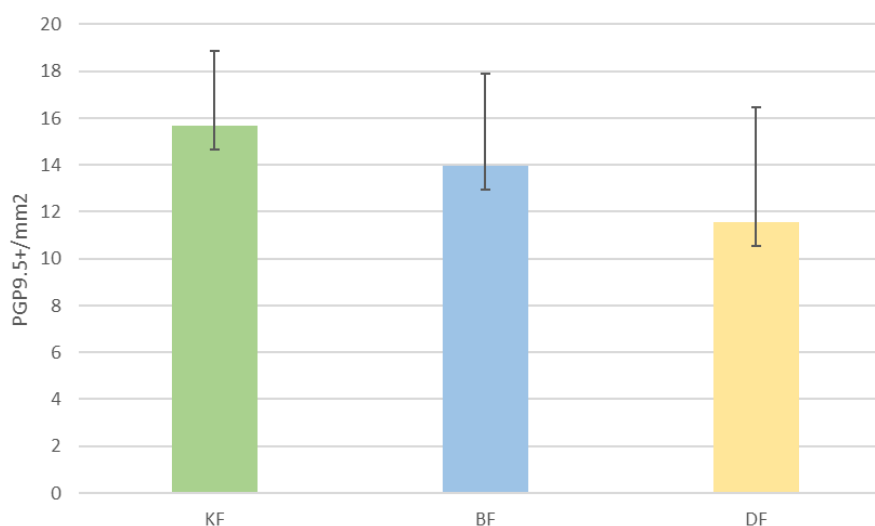
Dvosmjernim ANOVA testom istražen je utjecaj čimbenika spola na gustoću vlakana i utjecaj antihistaminika na gustoću vlakana te međusobni sinergistički utjecaj antihistaminika i spola na gustoću vlakana. Prema rezultatima vidljivo je da spol ima utjecaja na gustoću vlakana ($P = 0,046$) – sve ženske skupine imaju veću gustoću vlakana od muških skupina. Također, antihistaminici imaju utjecaja na gustoću vlakana ($P = 0,025$) – oba antihistaminika dovode do promjene gustoće vlakana. Međusobna interakcija dva odvojena faktora, spola i antihistaminika ne pridonosi statistički značajnoj razlici u gustoći vlakana, ($P = 0,487$), tj. ne postoji sinergistički učinak (tablica 1.).



Slika 1. Uška potomaka ženki Sprague Dawley štakora intrauterino izloženih utjecaju antihistaminika. Veličina skale 500 μ m. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja protutijelom PGP 9.5. Strelice su primjer pozitivne reakcije. Redovi (M – skupine muških potomaka Sprague Dawley štakorica, F – skupina ženskih potomaka Sprague Dawley) Stupci (K – kontrolne skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane antihistaminicima, B - skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom bilastinom, D - skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom desloratadinom, N – negativne kontrole imunohistokemijske reakcije bojenja protutijelom PGP 9.5), (fotografirala autorica).



Slika 2. Razlike u gustoći PGP 9.5 pozitivnih vlakana po mm² tkiva u muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom trudnoće tretirane ili nisu tretirane antihistaminicima desloratidinom i bilastinom. KM - skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane. BM – skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom, DM – skupina muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratidinom. ANOVA test. (* statistička značajnost $P < 0.05$)



Slika 3. Razlike u gustoći PGP 9.5 pozitivnih vlakana po mm² tkiva u ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom trudnoće tretirane ili nisu tretirane antihistaminicima desloratidinom i bilastinom. KF - skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane. BF – skupina ženskih potomaka Sprague

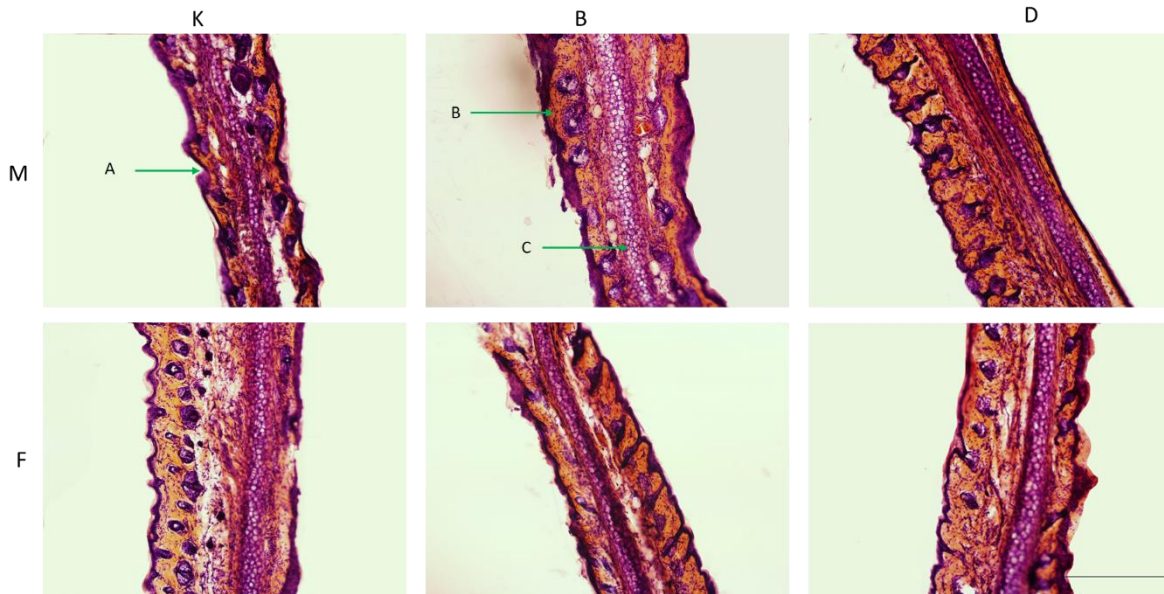
Dawley štakorica su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom, DF – skupina ženskih potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratadinom. ANOVA test.

Tablica 1. Rezultati usporedbe gustoće intraepidermalnih vlakana prema spolu i skupini antihistaminika. Dvosmjerni ANOVA testa. Redovi (Skupina – skupine životinja tretirane antihistaminicima ili netretirane kao jedan čimbenik čiji se utjecaj na gustoću vlakana promatra. Spol – drugi čimbenik čiji se utjecaj na gustoću vlakana promatra. Interakcija – utjecaj spola i skupina antihistaminika na gustoću vlakana. Pogreška – statistička pogreška). Stupci (df – stupnjevi slobode, F – vrijednost F raspodjele, P – statistička značajnost)

	df	F	P
Skupina	2	4,18	0,025
Spol	1	4,32	0,046
Interakcija	2	0,74	0,487
Pogreška	30		
Ukupno	35		

5.2. Rezultati hematoksilin-eozin bojenja

Morfološki prikaz strukture tkiva uške štakora po skupinama. Na uškama su bojenjem prikazani epidermis, dermis, hrskavica. Sva tkiva uške štakora izgledaju morfološki normalno. Nema promjena u strukturama. (slika 4.)



Slika 4. Uška potomaka ženki Sprague Dawley štakora koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane ili nisu tretirane antihistaminicima. Veličina skale: 500 μm . Prikaz rezultata histološkog bojenja hematoksilin-eozin. Redovi (M – skupine muških potomaka Sprague Dawley štakorica, F – skupina ženskih potomaka Sprague Dawley) Stupci (K – kontrolne skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje tijekom intrauterinog razvoja potomaka nisu tretirane antihistaminicima, B – skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom bilastinom, D – skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom desloratadinom). Oznake na fotografijama (A – epidermis, B – dermis, C – hrskavica), (fotografirala autorica).

Slika 4. Predstavlja skup fotografija po skupinama na kojima je vidljivo histološko bojenje hematoksilin-eozin. Pregledom preparata moguće je vidjeti različite strukture koje čine ušku Sprague Dawley štakora i prema njima je vidljivo da nema morfoloških razlika u uški. Strelicama i slovima su označene glavne strukture uške.

6. RASPRAVA

Gustoća intraepidermalnih vlakana u novije vrijeme ima sve važniju ulogu u detekciji raznih patoloških stanja koja imaju neurogenu komponentu, a također i bolesti koje primarno zahvaćaju mala živčana vlakna, a koje je posebno teško detektirati konvencionalnim metodama. Intraepidermalna vlakana imaju vrlo važnu ulogu u percepciji podražaja iz okoliša te potpomažu neurogenu upalu na periferiji putem antidromičnog odgovora. Zato su predmet mnogih istaživanja. C vlakana, koja čine najveći broj osjetnih intraepidermalnih vlakana, ispoljavaju histaminski receptor i podložni su utjecaju antihistaminika. Također se nalaze najbliže vanjskoj površini kože u epidermisu. Čine najdistalnije nociceptore (9 - 14). Promatranje utjecaja antihistaminika druge generacije na intrauterini razvoj fetusa je vrlo bitno zbog mogućnosti njihove uporabe tijekom trudnoće. Više od 60 % žena pati od mučnine u prvom tromjesječju dok 30 % ima neki oblik alergije za koje se koriste antihistaminici. Druga generacija antihistaminika nema sedacijski učinak, ne prelazi krvno-moždanu barijeru, slabo su lipofilni i imaju dugo djelovanje što ih čini puno boljim kandidatima za terapiju od antihistaminika prve generacije, ali su zbog kraće kliničke primjene slabije istraženi, a time je i sigurnost njihove primjene slabije poznata od prve generacije (73 - 76). Supstrati su za P-gp koji se nalazi i na placenti. P-gp izbacuje antihistaminike iz mozga i iz placente (53, 54).

Promatranje utjecaja antihistaminika na gustoću intraepidermalnih vlakana pomoću ANOVA testa pokazalo je statistički značajnu razliku između muške skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom bilastinom i muške skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminikom desloratadinom. Između kontrolne skupine muških potomaka koji nisu intrauterino bili izloženi antihistaminicima i eksperimentalnih skupina nema statistički značajne razlike. Vidljivo je da razlika između skupina životinja čije su majke izloženih antihistaminicima postoji. Potrebno je dodatno istražiti zašto i kako dolazi do te razlike jer se niti jedna skupina tretirana antihistaminicima ne razlikuje od kontrole. Statistički značajne razlike između ženskih skupina potomaka nema.

Dvosmjerni ANOVA test uzima spol, bez obzira muški ili ženski, kao jedan čimbenik koji može utjecati na gustoću vlakana. Skupine potomaka majki koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane antihistaminicima ili nisu uzima kao drugi čimbenik. Prema rezultatima testa vidljivo je da postoji statistički značajan utjecaj spola na gustoću intraepidermalnih vlakana. Prema grafičkom prikazu vidljivo je da ženke imaju veću gustoću

vlakana. Kada se skupine antihistaminika i kontrole promatraju kao drugi čimbenik također je vidljivo da postoji statistički značajan utjecaj antihistaminika na gustoću vlakana. Treba primjetiti da to ne znači statistički značajnu razliku između skupine antihistaminika i netretirane skupine nego da antihistaminici kao cjelina utječu na gustoću vlakana. Međusobna interakcija ta dva čimbenika na gustoću vlakana nije zamijećen, nemaju sinergistički učinak.

Istraživanja koja promatraju utjecaj spola na gustoću IENF, govore o blago povećanoj gustoći intraepidermalnih vlakana kod ženki (86). Jedno od istraživanja iznosi podatak o razlici u gustoći vlakana s obzirom na spol, ali kada su u obzir uzeli visinu i težinu ta razlika nije primjećena (87, 88). Razlike u epidermalnoj inervaciji između muškaraca i žena mogu biti povezane sa hormonalnim statusom. Pokazano je da progesteron stimulira aksonalni rast i mijelinizaciju i da može imati neuroprotektivnu ulogu (19). Druga istraživanja iznose rezultate o rostro-kaudalnom gradijentu smanjenja gustoće intraepidermalnih vlakana u nozi. Gustoća intraepidermalnih vlakana je značano niža u distalnom dijelu noge u usporedbi s proksimalnim bedrom i u promskimalnom bedru je značajno manja gustoća nego u trupu. Starenjem dolazi do gubitka mijeliziranih i nemijeliziranih vlakana, te redukcije broja neurona u DRG. Eksperimentalne studije kao rezultat navode da starije životinje pokazuju skupljanje osjetnih polja povezanih s funkcijom živčanih vlakana malog promjera. Nisu primjećene promjene u grananju neurona s dobi. Mlađe jedinice imaju značajno veću gustoću vlakana od starijih u području trupa (20, 21).

U slučaju neuropatija, IENF pokazuju vidljive morfološke promjene. Promatrane su idiopatske neuropatije i one koje su uzrokovane dijabetesom. Uzorci grananja vlakana slični kao u zdravim kontrolama mogu biti primjećeni iako vlakna kod jedinki sa neuropatijom pokazuju krivudaviji smjer kretanja i složenije grananje. Također je vidljivo intraaksonalno nateknuće i terminalni dijelove nalik na kandže. Skupine eksperimentalnih životinja sa neuropatijom pokazuju veći omjer grananja - ukupni broj grana/ukupan broj intraepidermalnih neurona, od zdravih kontrola. Istraživanje morfološkim promjena u senzornim neuropatijama pokazalo je manju gustoću intraepidermalnih vlakana u usporedbi sa zdravom kontrolom u svakom dijelu kože sa najvećom razlikom primjećenom u distalnom dijelu noge (21, 22).

Hipoteza da antihistaminici desloratadin i bilastin utječu na razvoj H1 pozitivnih intraepidermalnih živčanih završetaka fetusa je dokazana jer postoji razlika između skupina tretiranih antihistaminicima. Promatranjem utjecaj antihistaminika i spola kao dva razdvojena čimbenika i njihov utjecaj na gustoću vlakana vidljiv je statistički značajan utjecaj oba

čimbenika na gustoću vlakana. Jedan od mogućih razloga zašto je došlo do te statističke značajnosti je to što su postoji razlika između skupina tretiranih sa dva antihistaminika.

Prijašnja istraživanja nisu pokazala utjecaj antihistaminika na razvoj fetusa i nije dokazan teratogeni učinak na fetus (78 - 82). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem govore o statistički značajnom utjecaju primjene antihistaminika u majki na gustoću ispitivanih vlakana u koži potomaka. Istraživanja ranije navedena u raspravi i njihovi rezultati se slažu s rezultatom dvostrukog ANOVA testa dobivenog ovim istraživanjem koji kaže da spol ima utjecaj na gustoću vlakana.

Ovo istraživanje je prvo koje istražuje utjecaj antihistaminika na gustoću IENF kod potomaka čije su majke tijekom njihova intrauterinog razvoja tretirane antihistaminicima. Prema rezultatu dvosmjernog ANOVA testa koji pokazuje da antihistaminici kao cjelina imaju statistički značajan utjecaj na gustoću vlakana u potomaka, ali treba provesti dodatna istraživanja i odrediti mehanizam njihova djelovanja.

Ograničenje ove studije je nepostojanje adekvatnog računalnog programa kako bi se omogućila objektivnija analiza gustoće intraepidermalnih vlakana. Studije koje su istražile gustoću intraepidermalnih vlakana su koristile razne metode. Jedna od metoda je ručno brojanje PGP 9.5 pozitivnih vlakana koja je korištena u ovom radu, ali studije većinom koriste linearnu gustoću koja se izražava u broju PGP 9.5 pozitivnih vlakana/mm. U ovom istraživanju je korištena ukupna površina poprečnog presjeka uške koja se izražava u mm². Jedan od razloga zbog kojih linearna gustoća nije korištena i u tome se ova studija razlikuje od većine ostalih studija je ta da je korišteno drugačije tkivo, tkivo uške štakora. Ostale studije koriste biopstat kože točno određenih dimenzija (22).

Jedan od problema je i mogućnost brojenja sekundarnih grana istog senzornog vlakna. Za taj se problem razvijaju smjernice. Jedno od pravila, koje se nalazi u smjernicama Europskog neurološkog društva, nalaže brojanje samo onih vlakna koja se nalaze na epidermalno-dermalnom spoju ili se nalaze u epidermisu, time da se sekundarne grane ne broje (89). Uz smjernice i standardiziranje protokola za određivanje gustoće intraepidermalnih vlakana moguće je u istraživanju animalnih modela stvoriti temelj za uspoređivanje podataka i stvaranja baza podataka specifičnih za vrstu (90). Još jedna od mogućnosti koja je istražena je i metoda analiza slike subtrakcijom boje pomoću računala (engl. *subtractive-computer-assisted image analysis*, CS-CAIA). Model izračuna gustoće vlakana pomoću CS-CAIA sustava je brži, objektivniji i lakše ga je reproducirati (91).

Potrebno je uvesti standardizirane metode pomoću računalnih programa za utvrđivanje gustoće intraepidermalnih vlakana. Dalje se mogu napraviti funkcionalni i bihevioralni testovi. Možemo usporediti antihistaminik prve generacije s onima druge generacije jer smo u ovom istraživanju koristili dva antihistaminika 2. generacije.

Rezultati ove studije govore da postoji utjecaj antihistaminika na gustoću vlakana. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kojima bi se ispitalo na koje sve načine primjena antihistaminika može utjecati na gustoću živčanih vlakana i kojim točno mehanizmom dolazi do promjena u potomaka tretiranih majki. Relativno česta upotreba antihistaminika kod trudnica zahtjeva daljnja istraživanja kako bi se prikupilo što više korisnih rezultata i omogućilo bolje razumijevanje utjecaja na intraepidermalna vlakna i ostale dijelove organizma potomaka koji su bili intrauterino izloženi utjecaju antihistaminika. Sama intraepidermalna vlakna su bitna u nocicepciji kao i modulaciji upale na periferiji. Važno je razumjeti moguć utjecaj primjene antihistaminika u trudnoći na razvoj i gustoću intraepidermalnih vlakana te na razvoj organizma koji je intrauterino bio izložen antihistaminicima i/ili njihovim metabolitima.

7. ZALJUČAK

- Uočena je statistički značajna razlika gustoće intraepidermalnih živčanih vlakana uspoređivanjem muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom i muških potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane desloratadinom.
- Gustoća intraepidermalnih živčanih vlakana u ženskoj skupini potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom i desloratadinom ne razlikuje se značajno u odnosu na potomke netretiranih majki.
- Spol ima utjecaj na gustoću intraepidermalnih vlakana kao i izloženost antihistaminicima, ali ne postoji međusobni sinergizam spola i antihistaminika na gustoću intraepidermalnih vlakana.

8. SAŽETAK

Ciljevi: Koristeći hematoksilin-eozin histološko bojenje tkiva prikazati morfološke karakteristike tkiva uške štakora starosti 3 mjeseca eksperimentalnih skupina životinja (potomci majki tretiranih antihistaminicim) u odnosu na kontrolnu skupinu (potomci netretiranih majki). Imunokemijskim bojenjem tkiva na specifičan marker C i A δ vlakana, protein produkt gena 9.5 (PGP9.5), usporediti gustoću intraepidermalnih živčanih vlakana po mm² poprečnog presjeka uške u životinja eksperimentalnih skupina s kontrolama.

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 desloratidinom ili bilastinom, odnosno nisu tretirane. Skupine su dalje podijeljene na muške i ženske potomke (ukupno 6 skupina).

Materijali i metode: Imunohistokemijskom analizom pomoću protutijela PGP 9.5 i hematoksilin-eozin bojenja određena je gustoća intraepidermalnih vlakana i morfološke karakteristike tkiva uške.

Rezultati: Postoji statistički značajna razlika između muške skupine potomaka Sprague Dawley štakorica koje su tijekom intrauterinog razvoja potomaka tretirane bilastinom i muške skupine tretirane desloratadinom. Rezultat dvostranog ANOVA testa prikazuje statistički značajan utjecaj spola i antihistaminika na gustoću vlakana.

Zaključak: Ženke imaju veću gustoću H1 pozitivnih intraepidermalnih vlakana od mužjaka. Ne može se isključiti mogućnost intrauterinog djelovanja bilastina i desloratadina.

Ključne riječi: antihistaminici; intraepidermalna vlakna; PGP 9.5, trudnoća

9. SUMMARY

Intraepidermal fiber density in Sprague Dawley rats following intrauterine treatment with antihistamines desloratadine and bilastin

Objectives: Using haematoxylin-eosin histological staining of tissue to show morphological characteristics of ear tissue of rats aged 3 months in experimental groups of animals (offsprings of mothers treated with antihistamines) in relation to the control group (offsprings of untreated mothers). With immunochemical staining of tissues for a specific marker of C and A δ fibers, protein gene product 9.5 (PGP9.5), compare the density of intraepidermal fibers per mm² of cross-section of the ear in experimental groups of animals with controls.

Study Design: The 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 desloratidine or bilastine since the 10th gestational day of pregnancy, or had not been treated. The groups were further divided into male and female offsprings (6 groups in total).

Materials and methods: With immunohistochemical analysis using PGP 9.5 antibody and haematoxylin-eosin staining, density of intraepidermal fibers and the morphological characteristics of the ear tissue were determined.

Results: There is a statistically significant difference between the male group of offsprings of Sprague Dawley rats treated with bilastine during intrauterine development of the offspring and the male group treated with desloratadine. The result of a two-way ANOVA test shows a statistically significant effect of gender and antihistamines on fiber density.

Conclusion: Female rats have a higher density of H1 positive intraepidermal fibers than males. The possibility of intrauterine action of bilastine and desloratadine cannot be ruled out.

Key words: antihistamines; intraepidermal fibers; PGP 9.5; pregnancy

10. LITERATURA

1. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54:3–17.
2. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Clin Invest Med.* 2017;45(6):347–351.
3. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2015;25(2):92–98.
4. Roop D. Defects in the barrier. *Science.* 1995;267:474-477.
5. Alvarez FJ, Fyffe RE. Nociceptors for the 21st century. *Curr Rev Pain.* 2000;4:451–458
6. Oaklander AL, Siegel SM. Cutaneous innervation: Form and function. *J Am Acad Dermatol.* 2006;53:1027–1037.
7. Karlsson P, Porretta-Serapiglia C, Lombardi R, Jensen TS, Lauria G. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18(1):48–53.
8. Cazzato D, Lauria G. Small fibre neuropathy. *Curr Opin Neurol.* 2017;30(5):490–499.
9. Reddi D, Curran N, Stephens R. An introduction to pain pathways and mechanisms. *Br J Hosp Med.* 2013;74:188-191.
10. Talagas M, Lebonvallet N, Berthod F, Misery L. Cutaneous nociception: role of keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2019;1-4.
11. Sohn EH. Skin biopsy: an emerging method for small nerve fiber evaluation. *Clin Neurophysiol.* 2018;20(1)1-3.
12. Frias B, Merighi A. Capsaicin, nociception and pain. *Molecules.* 2016;21(6):797.
13. Andrew D, Craig AD: Spinothalamic lamina 1 neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci.* 2001;4:72–77.
14. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006;86:1309–1379
15. Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci.* 1995;15:333–341.

16. Schwendinger-Schreck J, Wilson SR, Bautista DM. Interactions between keratinocytes and somatosensory neurons in itch. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;177–190.
17. Pereira MP, Mühl S, Pogatzki-Zahn EM, Agelopoulos K, Ständer S. Intraepidermal nerve fiber density: Diagnostic and therapeutic relevance in the management of chronic pruritus: a review. *Dermatol Ther.* 2016;6(4):509–517.
18. Karlsson P, Porretta-Serapigli C, Lombardi R, Jensen TS, Lauria G. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18(1):48–53.
19. Terkelsen AJ, Karlsson P, Lauria G, Freeman R, Finnerup NB, Jensen TS. The diagnostic challenge of small fibre neuropathy: clinical presentations, evaluations, and causes. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):934–944.
20. Liu Y, Fan X, Wei Y, Piao Z, Jiang X. Intraepidermal nerve fiber density of healthy human. *Neurol Res.* 2014;36(10):911–914.
21. Lauria G, Holland N, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *J Neurol Sci.* 1999;164(2):172–178.
22. Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J Peripher Nerv Syst.* 2010;15(3):202–207.
23. Ansel JC, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Caughman SW, Bunnett NW. Interactions of the skin and nervous system. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1997;2:23–26.
24. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 2017;38(1):5–19.
25. Lisowska B, Lisowski A, Siewruk K. Substance P and chronic pain in patients with chronic inflammation of connective tissue. *PLoS One.* 2015;10(10):1–12.
26. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel, JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol.* 1998;7:81–96.
27. Helke C, Krause J, Mantyh P, Collature R, Bannon M: Diversity in tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors and regulatory mechanisms. *FASEB J.* 1990;4:1606-1615.

28. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(22):4249–4264.
29. Meixiong J, Dong X. Mas-related G protein–coupled receptors and the biology of itch sensation. *Annu Rev Genet*. 2017;51(1):103–121.
30. Choi JE, Di Nardo A. Skin neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol*. 2018;40(3):249–259.
31. Umeno E, Nadel JA, Huang HT, McDonald DM. Inhibition of neutral endopeptidase potentiates neurogenic inflammation in the rat trachea. *Int J Basic Appl Physiol*. 1989;66:2647–2652.
32. Sopacua M, Hoeijmakers JGJ, Merkies ISJ, Lauria G, Waxman SG, Faber CG. Small fibre neuropathy: expanding the clinical pain universe. *J Peripher Nerv Syst*. 2019;24:19-33.
33. Bakkers M, Faber C, Hoeijmakers JGJ, Lauria G, Merkies ISJ. Small fibers, large impact: Quality of life in small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve*. 2013;49:329–336.
34. Themistocleous AC, Ramirez J D, Serra J, Bennett DLH. The clinical approach to small fibre neuropathy and painful channelopathy. *Pract Neurol*. 2014;14:368-379.
35. Karlsson P, Porretta-Serapiglia C, Lombardi R, Jensen TS, Lauria G. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. *J Peripher Nerv Syst*. 2013;18(1):48–53.
36. Gasparotti R, Padua L, Briani C, Lauria G. New technologies for the assessment of neuropathies. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(4):203–216.
37. Kaliappan S, Simone DA, Banik RK. Nonlinear inverted-U shaped relationship between aging and epidermal innervation in the rat plantar hind paw: A laser scanning confocal microscopy study. *J Pain*. 2018;19(9):1015–1023.
38. Lauria G, Lombardi R, Camozzi F, Devigili G. Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology*. 2009;54(3):273–285.
39. Collongues N, Samama B, Schmidt-Mutter C, Chamard-Witkowski L, Debouverie M, Chanson JB. Quantitative and qualitative normative dataset for intraepidermal nerve fibers using skin biopsy. *PLoS One*. 2018;13(1):1-14.
40. Huang H, Li Y, Liang J, Finkelman FD. Molecular regulation of histamine synthesis. *Front Immunol*. 2018;9:1-7.
41. Valko PO, Gavrilov YV, Yamamoto M. Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy. *Ann Neurol*. 2013;74:794-804.

42. Church, MK. Allergy, histamine and antihistamines. *Handb Exp Pharmacol.* 2016; 321–331.
43. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine release from mast cells and basophils. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;121–139.
44. Puttonen HAJ, Semenova S, Sundvik M, Panula P. Storage of neural histamine and histaminergic neurotransmission is VMAT2 dependent in the zebrafish. *Sci Rep.* 2017;7:1-12.
45. Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R. Histamine H1-receptor activation of nuclear factor-kB: roles for Gbg- and Gaq/11-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol.* 2001;60:1133-42.
46. Mandola A, Nozawa A, Eiweggera T. Histamine, histamine receptors, and anti-histamines in the context of allergic responses. *LymphoSign Journal.* 2019;6:35-51.
47. Ohsawa Y, Hirasawa N. The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and antiinflammatory effects in NC/Nga mice. *Allergy.* 2012;67:1014–1022.
48. Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H2-receptors. *Nature.* 1972;236:385–390.
49. Arrang JM, Garbarg M, Lancelo JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M. Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature.* 1987;327:117–123.
50. Lindskog M. Histamine receptors in the cross-talk between periphery and brain. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;20(5):400–402.
51. Church MK. Comparative inhibition by bilastine and cetirizine of histamine-induced wheal and flare responses in humans. *Inflamm. Res.* 2011;60:1107–1112.
52. Shirley DW, Sterrett J, Haga N, Durham C. The therapeutic versatility of antihistamines. *Nurse Pract.* 2020;45(2):8–21.
53. Sahin L, Nallani S, Tassinari M. Medication use in pregnancy and the pregnancy and lactation labeling rule. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016;100:23–25.
54. Hu Y, Sieck DE, Hsu WH. Why are second-generation H1-antihistamines minimally sedating? *Eur J Pharmacol.* 2015;765:100–106.
55. Yanai K, Zhang D, Tashiro M, Yoshikawa T, Naganuma F, Harada R, et al. Positron emission tomography evaluation of sedative properties of antihistamines. *Expert Opin Drug Saf.* 2011;10:613-22.

56. Yanai K, Yoshikawa T, Yanai A, Nakamura T, Iida T, Leurs R, Tashiro M. The clinical pharmacology of non-sedating antihistamines. *Pharmacol Ther.* 2017;178:148–156.
57. Randall KL. Antihistamines and allergy. *Aust Prescr.* 2018;41(2):42–45.
58. Affrime M, Gupta S, Banfield C, Cohen, A. A pharmacokinetic profile of desloratadine in healthy adults, including elderly. *Clin. Pharmacokinet.* 2002;41:13–19.
59. Anthes JC, Gilchrest H, Richard C, Eckel S, Hesk D, West RE Williams SM, Greenfeder S, Billah M, Kreutner W, Egan RE. Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;449:229–237.
60. Huybrechts KF, Bateman BT, Hernández-Díaz S. Use of real-world evidence from healthcare utilization data to evaluate drug safety during pregnancy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2019;28:906-22.
61. Wilton LV, Pearce GL, Martin RM, Mackay FJ, Mann RD. The outcomes of pregnancy in women exposed to newly marketed drugs in general practice in England. *Obstet Gynecol Int J.* 1998;105:882–889.
62. Andersson NW, Poulsen HE, Andersen JT. Desloratadine use during pregnancy and risk of adverse fetal outcomes: a nationwide cohort study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(5):1-8.
63. Antonijoan R, Coimbra J, García-Gea C, Puentes M, Gich I, Campo C, i ostali. Comparative efficacy of bilastine, desloratadine and rupatadine in the suppression of wheal and flare response induced by intradermal histamine in healthy volunteers. *Curr. Med. Res. Opin.* 2017;33:129–136.
64. Lucero ML, Arteché JK, Sommer EW, Casadesus A. Preclinical toxicity profile of oral bilastine. *Drug Chem Toxicol.* 2012;35(1):25–33.
65. Francetić I. i suradnici. *Farmakoterapijski priručnik.* 6. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2010;799–821.
66. Motosko CC, Bieber AK, Pomeranz MK, Stein JA, Martires KJ. Physiologic changes of pregnancy: A review of the literature. *Int J Womens Dermatol.* 2017;3(4):219–224.
67. Ygge J. On the organization of the thoracic spinal ganglion and nerve in the rat. *Exp Brain Res.* 1984;55:395-401.

68. Pijnenborg R. Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects. *Trophoblast Res.* 1990;4:33–47.
69. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61:1296–1302.
70. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res Suppl.* 2004;114:397–407.
71. Lynch MM, Squiers LB, Kosa KM, Dolina S, Read JG, Broussard CS, Biermann J. Making decisions about medication use during pregnancy: Implications for communication strategies. *Matern Child Health J* 2017;22(1):92–100.
72. Joshi AA, Vaidya SS, St-Pierre MV, Mikheev AM, Desino KE, Nyandege AN. Placental ABC transporters: Biological impact and pharmaceutical significance. *Pharm Res.* 2016;33(12):2847–2878.
73. Stephansson O, Granath F, Svensson T, Haglund B, Ekblom A, Kieler H. Drug use during pregnancy in Sweden - assessed by the Prescribed drug register and the medical birth register. *Clin Epidemiol.* 2011;3:43-50.
74. Ridolo E, Caminati M, Martignago I, Melli V, Salvottini C, Rossi O. Allergic rhinitis: pharmacotherapy in pregnancy and old age. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2016;9(8):1081–1089.
75. Keleş N. Treatment of allergic rhinitis during pregnancy. *Am J Rhinol.* 2004;18:23-8.
76. Pali-Schöll I, Namazy J, Jensen-Jarolim E. Allergic diseases and asthma in pregnancy, a secondary publication. *World Allergy Organ J.* 2017;10(1):1-8.
77. Dean CR, Shemar M, Ostrowski GAU, Painter RC. Management of severe pregnancy sickness and hyperemesis gravidarum. *Br Med J.* 2018;363:1-8.
78. Haas DM, Marsh DJ, Dang DT, Parker CB, Wing DA, Simhan HN. Prescription and Other Medication Use in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2018;131(5):89–798.
79. Gilbert C, Mazzotta P, Loebstein R, Koren G. Fetal safety of drugs used in the treatment of allergic rhinitis: a critical review. *Drug Saf.* 2005;28:707-719.
80. Etwel F, Faught LH, Rieder MJ, Koren G. The risk of adverse pregnancy outcome after first trimester exposure to H1 antihistamines: A systematic review and meta-analysis. *Drug Saf.* 2016;40(2):121–132
81. Einarson A, Bailey B, Jung G. A prospective controlled study of hydroxyzine and cetirizine in pregnancy. *Ann All Asthma Immunol.* 1997;78:183–6.
82. Ryan RM, McCarthy FP. Connective tissue and dermatological disorders in pregnancy. *Obst Gynaecol Reprod Med.* 2018; 28(9):284–294.

83. Shawky RM, Seifeldin NS. The relation between antihistamine medication during early pregnancy and birth defects. *Glob Med Genet.* 2015;16:287–290.
84. Stanley AY, Durham CO, Sterrett JJ, Wallace JB. Safety of over-the-counter medications in pregnancy. *MCN Am J Matern Child Nurs.* 2019;44(4):196–205.
85. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682.
86. Shun CT, Chang YC, Wu HP. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain.* 2004;127:1593-1605.128.
87. Umapathi T, Tan WL, Tan NCK, Chan YH. Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve.* 2006;33:742–746.
88. O'Brien PD, Hur J, Robell NJ, Hayes JM, Sakowski SA, Feldman EL. Gender-specific differences in diabetic neuropathy in BTBR ob/ob mice. *J. Diabetes Complicat.* 2016;30:30-37.
89. Lauria G, Penza P, Melli G. European interlaboratory agreement project on skin biopsy standardization and innervation count. *J Peripher Nerv Syst.* 2007;12:49-50.
90. Mangus LM, Rao DB, Ebenezer GJ. Intraepidermal nerve fiber analysis in human patients and animal models of peripheral neuropathy: a comparative review. *Toxicol Pathol.* 2019; 1-12.
91. Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE. Color subtractive–computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1285–1291.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Doris Lulić

Datum rođenja i mjesto rođenja: 13. srpnja 1996, Osijek.

Adresa stanovanja: Ante Starčevića 124, Kuševac

Kontakt: 095/398-0009

Obrazovanje:

2018. – 2020. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Os

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Prirodoslovna gimnazija, Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek

2003. – 2011. Osnovna škola Josipa Antuna Čolnića Đakovo

Sudjelovanje na projektima i kongresima:

2020. – 2nd Osijek Student Congress OSCON (sudionik i volonter)

2019. – Cedars Sinai Medical Center and RECOOP HST Association – 2nd International student conference (nagrada za prezentaciju i poster)

2013. - "Youth for EU – Mladi za Europu"

2014. – "Popeye – promoting organic production"

Volontiranje:

2020. – 2nd Osijek Student Congress OSCON

2019. – 18. Tjedan mozga

2013. – Centar za rehabilitaciju, odgoj i obrazovanje djece, Zlatni cekin