

# Utjecaj antihistaminika desloratadina i bilastina na razvoj mozga Sprague Dawley štakora

---

**Mikulec, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:152:668208>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Katarina Mikulec**

**UTJECAJ ANTIHISTAMINIKA  
DESLORATADINA I BILASTINA NA  
RAZVOJ MOZGA SPRAGUE DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Katarina Mikulec**

**UTJECAJ ANTIHISTAMINIKA  
DESLORATADINA I BILASTINA NA  
RAZVOJ MOZGA SPRAGUE DAWLEY  
ŠTAKORA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u: Laboratorij za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu Osijek.

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

Rad ima 60 listova, 1 tablicu i 33 slike.

## **ZAHVALE:**

### ***„Per aspera ad astra“***

*Prije svega hvala mentorici prof. dr. sc. Mariji Heffer koja me je po drugi put primila pod svoje mentorstvo i time omogućila izradu diplomskog rada. Hvala Vam na svom strpljenju i savjetima koje ste mi dali.*

*Želim se zahvaliti i Vedrani Ivić. Veki, tebi jedno ogromno hvala na svim uputama i pomoći koju si mi pružila tijekom izrade diplomskog rada. Hvala ti na strpljenju i vremenu izdvojenom za moje brojne upite jer bez tebe ovaj rad ne bi bio potpun. Također, hvala ti za smijeh i ugodno društvo u labosu koje je uvelike olakšalo cijeli ovaj proces.*

*Posebno hvala cijeloj mojoj obitelji! Tko zna gdje bih danas bila bez vas, vaše potpore i ljubavi. Bili ste tu za mene u svakom trenutku mog studiranja, dobrom ili lošem, podržali me i gurali naprijed. Najveće hvala dugujem vama jer uz vas je sve ovo bilo „piece of cake“!*

*Zahvaljujem se i svome dečku Ivanu. Ponosno stojiš uz mene na svakom koraku mog puta i vjeruješ u moje sposobnosti. Olakšavaš mi život iz dana u dan i na svemu tome ti veliko hvala!*

*Hvala i mojim prijateljicama Ljilji i Doris. Bio je ovo dug put kroz trnje do zvijezda, ali isplatilo se! Hvala vam što ste uvijek bile uz mene i slušale sva jadikovanja. Hvala na svakom savjetu, podršci i najviše vam hvala za smijeh bez kojeg bi studiranje bilo puno teže. Bolje prijateljice nisam mogla poželjeti!*

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Histamin .....	1
1.1.1. H1 receptori.....	2
1.2. Antihistaminici .....	2
1.2.1. Bilastin .....	5
1.2.2. Desloratadin .....	6
1.2.3. Antihistaminici u trudnoći i urođene mane .....	7
1.3. Glijalni fibrilarni kiseli protein .....	8
1.4. Neuronski jezgrin protein.....	8
1.5. Neuroplastin 65 .....	8
2. HIPOTEZA .....	10
3. CILJEVI .....	11
4. MATERIJALI I METODE .....	12
4.1. Ustroj studije .....	12
4.2. Materijali .....	12
4.3. Metode.....	12
4.3.1. Bojenje po Nisslu .....	13
4.3.2. Imunohistokemijske metode .....	13
4.4. Računalna analiza histoloških i imunohistokemijskih rezultata.....	15
4.4.1. Analiza debljine slojeva moždane kore u slušnoj i motoričkoj regiji .....	15
4.4.2. Prebrojavanje stanica nakon imunohistokemijskog bojenja .....	16
4.4.3. Analiza izražaja staničnih proteina .....	20
4.5. Statističke metode .....	21
5. REZULTATI.....	23
5.1. Analiza anatomije mozga .....	23
5.2. Analiza debljine slojeva moždane kore u slušnoj i motoričkoj kori mozga.....	25
5.3. Usporedba omjera neurona i astroglije u slušnoj i motoričkoj kori mozga eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu .....	27
5.4. Analiza izražaja histaminskog receptora 1 .....	31
5.5. Analiza izražaja neuroplastina 65.....	39
6. RASPRAVA.....	47
7. ZAKLJUČAK .....	51
8. SAŽETAK.....	52

9. SUMMARY .....	53
10. LITERATURA.....	54
11. ŽIVOTOPIS .....	59



## POPIS KRATICA

AMPK	adenozin monofosfat-kinaza (engl. <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> )
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> )
BSA	goveđi serum (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CDC	Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. <i>Center for Disease Control and Prevention</i> )
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> )
CYP	citokrom P450 (engl. <i>cytochrome P450</i> )
DAB	diaminobenzidin (engl. <i>3,3'-diaminobenzidine</i> )
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GPCR	obitelji receptora vezanih s G proteinima (engl. <i>G protein-coupled receptors</i> )
IDV	vrijednost integrirane gustoće (engl. <i>integrated density value</i> )
IP <sub>3</sub>	inozitol 1,4,5-trisfosfat (engl. <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i> )
NeuN	neuronski jezgrin protein (engl. <i>neuronal nuclear protein</i> )
Np55	neuroplastin 55 (engl. <i>neuroplastin 55</i> )
Np65	neuroplastin 65 (engl. <i>neuroplastin 65</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PKC	protein kinaza C (engl. <i>protein kinase C</i> )
PLC	fosfolipaza C (engl. <i>phospholipase C</i> )
SNR	supstancija nigra (engl. <i>substantia nigra</i> )

## 1. UVOD

### 1.1. Histamin

Histamin je kemijski glasnik koji se sintetizira iz aminokiseline histidina pomoću L-histidin dekarboksilaze, enzima izraženog u različitim tipovima stanica (1). Važan je neurotransmiter središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS) kralježnjaka, koji regulira različite centralne odgovore i funkcije, kao što su budnost, hranjenje, pijenje, neuroendokrini sustav, tjelesnu temperaturu, analgeziju i motoričku aktivnost (2). Javlja se u stanicama neuroepitelnog i hematopoetskog podrijetla te također služi za: izlučivanje želučane kiseline, imunomodulaciju, kontrakciju glatkih mišića (bronha), vazodilataciju, kao i kontrolu epitelne i endotelne barijere. Stoga ima važne implikacije na gastrointestinalne, imunološke, kardiovaskularne i reproduktivne funkcije (3). Također, histaminska signalizacija kontrolira nagon za konzumiranje hrane tako što ga smanjuje. Nedavni radovi pokazali su da histamin može imati važnu ulogu i u nenormalnim apetitima, ne samo za hranu već i za tvari zlouporabe (4). Mnogo je studija koje su se bavile histaminergičkim mehanizmima signalizacije u staničnim linijama podrijetlom iz tumora mozga. Eksperimenti na tumorima mozga prikazuju i H1 i H2 receptore te povećanu histaminsku propusnost u tumorima i u susjednim područjima. Međutim, uloga histamina u normalnom razvoju moždanih struktura, proliferaciji i diferencijaciji neurona i glijalnih stanica te rastu malignih tumora još uvijek je slabo shvaćena. Histamin je također jedan od čimbenika koji reguliraju protok krvi u tumorima mozga. Stoga je moguće da ovi mehanizmi doprinose rastu i razvoju tumora mozga (5).

Histaminergični neuroni nalaze se u hipotalamičkoj tuberomamilarnoj jezgri, skupini magnocelularnih neurona koji se nalaze u stražnjoj i ventralnoj regiji hipotalamusa, u neposrednoj blizini stražnjeg udubljenja trećeg ventrikula (2, 6). Iz ove jezgre šalju se difuzne projekcije u gotovo sve regije mozga (2). Histaminergični aksoni inerviraju mnoga područja mozga, od prefrontalnog korteksa do leđne moždine, putem metabotropnih receptora H1, H2 i H3 koji u konačnici dovode ili do ekscitacije postsinaptičkih neurona ili modulacije njihovih neurotransmiterskih odgovora (6). Tri (H1, H2 i H3) od četiri histaminska receptora široko su rasprostranjeni u CNS-u. Postsinaptički smješteni H1 i H2 receptori aktiviraju nizvodne signalne putove; H1 receptor aktivira fosfolipaza C-protein kinaza C nizvodni signalni put, a H2 receptor aktivira signalni put fosfokinaze A. H3 receptor smješten je presinaptički i postsinaptički te je pretežno proučavan kao autoreceptor. Blokiranje H3 receptora pojačava

oslobađanje histamina koji zauzvrat modulira neuronsku funkciju i plastičnost te je kao takvo predloženo za liječenje mentalnih poremećaja (7). Neuronska ekspresija H4 receptora također je dokumentirana, ali je slabije istražena. Sva četiri receptora pripadaju obitelji receptora vezanih s G proteinima (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR) (2).

### 1.1.1. H1 receptori

Ljudski H1 receptor je protein građen od 487 aminokiselina, kodiran genom na kromosomu 3 (3p25). Ulazi u interakciju s Gq/11 proteinima kako bi aktivirao fosfolipazu C (engl. *phospholipase C*, PLC), promovirajući tako inozitol 1,4,5-trisfosfat (engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP<sub>3</sub>) ovisno otpuštanje Ca<sup>2+</sup> iona iz unutarstaničnih prostora i diacilglicerol-posredovanu aktivaciju protein kinaze C (engl. *protein kinase C*, PKC). Otpuštanje Ca<sup>2+</sup> iz unutarstaničnih prostora dovodi do otvaranja kalcijevih kanala na staničnoj membrani te aktivacije natrij/kalcij izmjenjivača (2, 8). Drugi putevi signalizacije koji pokreću H1 receptor uključuju proizvodnju arahidonske kiseline, dušičnog oksida i cikličkog gvanozin-monofosfata (engl. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) kroz stimulaciju fosfolipaze A2 (PLA<sub>2</sub>), NO sintaze ovisne o Ca<sup>2+</sup> i gvanilil ciklaze ovisne o NO. Navedena stimulacija posredovana je Gi/o proteinom osjetljivim na toksin pertusis (2, 9). H1 receptori aktiviraju adenozin monofosfat-kinazu (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK), kontrolnu točku metabolizma energije, te nuklearni čimbenik kappa B, ključni transkripcijski čimbenik uključen u nadzor proliferacije i preživljenja (9).

## 1.2. Antihistaminici

Antihistaminici su lijekovi koji se koriste za liječenje alergijskih poremećaja. Imunološki sustav ima razne načine kako se nositi sa stranim organizmima koji ga napadaju. Ako strani organizam uspije pobijediti vanjsku liniju obrane i ući u organizam, nastupa jedan od dva načina obrane – urođeni (nespecifičan) ili stečeni (specifičan) imunološki odgovor. Kod ponovnog izlaganja stranom organizmu, dolazi do lučenja IgE protutijela te posljedične degranulacije mastocita koji otpuštaju histamin, heparin i neutralnu proteazu u izvanstanični okoliš. Specifična uloga histamina je da okoliš učini neprijateljski nastrojenim prema uljezu tako što povećava lučenje sluzi, izaziva svrbež, kihanje, kašljanje ili proljev, odnosno pospješuje mehaničko uklanjanje ovisno o napadnutom organu (10).

Prva generacija antihistaminika otkrivena je prije otprilike 60 godina i dostupna je 40-ak godina. Ova sredstva su visoko potentni kompetitivni inhibitori histamina koji djeluju na H1

receptorsko mjesto na ciljnim stanicama u sluznici respiratornog sustava. Međutim, vrlo su lipofilni i lako prolaze krvno-moždanu barijeru (engl. *blood-brain barrier*, BBB) gdje blokiraju H1 receptorska mjesta u mozgu te izazivaju nuspojave (uključujući umor, pospanost, promjene raspoloženja, nemotiviranost) (11). Zbog navedenih nuspojava, nužno je da lijekovi sadrže upozorenja da korisnici ne upravljaju automobilom ili nekim opasnim strojem dok ih koriste. Istraživanja su pokazala slabiju koncentraciju u školi kod djece liječene antihistaminicima prve generacije u odnosu na djecu liječenu antihistaminicima druge generacije. Također, pokazalo se kako su ovi sedativni antihistaminici uzrok i avionskih nesreća (11, 12).

Druga generacija antihistaminika razvijena je kako bi se smanjila ili potpuno eliminirala sedacija i štetni antikolinergički učinci koji se javljaju kod starijih antagonista H1 receptora. Lijekovi iz ove generacije relativno su lipofobni i imaju mali volumen distribucije te slabije prolaze kroz BBB (13). Stoga se smatraju najvećim farmakološkim napretkom u usporedbi sa svojim predcima te su se pokazali važnim terapijskim alatom u liječenju atopijske bolesti. Dostupno je mnogo antihistaminika druge generacije, no na prvi pogled se čini kako ih je malo za birati u smislu sigurnosti i djelotvornosti. Međutim, s vremenom je postalo očito da noviji antihistaminici zapravo predstavljaju heterogenu skupinu spojeva, različitih kemijskih struktura, s varijacijama u terapijskim profilima, štetnim učincima, poluživotu, raspodjeli u tkivima, metabolizmu i različitim stupnjevima antialergijskih učinaka (14).

Farmakokinetika lijekova druge generacije ima sličan osnovni dio, no radikali ili bočni lanci su ti koji određuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju. Apsorpcija nakon oralne primjene varira od prilično dobre do izvrsne. Najviša koncentracija u plazmi općenito se postigne za 1 do 4 sata; cetirizin je najbrži i djeluje kroz pola sata, dok je azelastin najsporiji i doseže terapijsku dozu nakon 5 sati (13). Bitno je uzeti pravu dozu lijeka zbog varijacija u metabolizmu i raspodjeli u tkivima. Aktivnost i/ili toksičnost ovisna je o dva procesa: a) metabolizmu roditeljske tvari i aktivnim metabolitima u jetri, b) uklanjanju aktivnog lijeka i/ili metabolita putem žuči ili bubrega. Većina antihistaminika druge generacije podvrgava se opsežnom metabolizmu prvog prolaska do farmakološki aktivnih metabolita. Zajedničko im je obilježje da je reakcija potpomognuta citokromom P450 (engl. *cytochrome P450*, CYP) koji pripada CYP3A4 obitelji (13, 14). Neki metaboliti su 2 do 4 puta potentniji nego roditeljska tvar ili imaju sličnu potentnost s roditeljskom tvari. Ako je funkcija jetre oštećena, ili bolešću ili inhibicijom CYP sustava, roditeljska se tvar može nakupljati i može doći do toksičnosti. Svi antihistaminici druge generacije pokazuju klinički značajan bubrežni klirens i time dobru eliminaciju bubrezima (13).

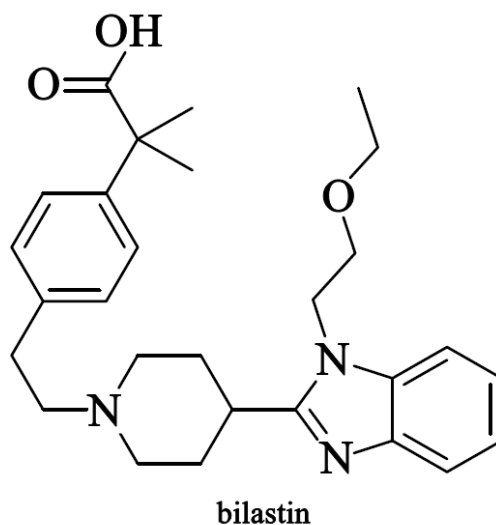
Razlike u ukupnom poretku s obzirom na djelotvornost i sigurnost između raspoloživih antihistaminika druge generacije, ako se primjenjuju u ekvivalentnim dozama, nisu velike. Međutim, među trenutno dostupnim antihistaminicima, feksofenadin može ponuditi najbolju opću ravnotežu učinkovitosti i sigurnosti, i ovaj lijek je prikladan izbor za početnu terapiju ili prilikom izmjene terapija za većinu pacijenata s blagim ili umjerenim alergijskim simptomima. Cetirizin je prikladan za pacijente koji ne reagiraju na druge antihistaminike i za one s najtežim simptomima koji bi mogli imati korist od liječenja s najvišom potencijom koja može titrirati dozu do maksimalnog intenziteta (15).

Antihistaminici su jedni od najčešćih lijekova koji se intenzivno koriste u raznim dermatološkim i nedermatološkim stanjima. Korištenje H1 antihistaminika tijekom trudnoće bilo je vrlo kontroverzno zbog mogućih teratogenih učinaka ovih lijekova (16). Prosječno 10-15 % žena uzimaju antihistaminike tijekom trudnoće za olakšavanje mučnina i povraćanja, alergija i simptoma astme ili zbog loše probave, posebice u prvom tromjesečju (17). Nijedan od trenutno dostupnih antihistaminika nije kategoriziran kao siguran tijekom trudnoće. Kontrolne studije dostupne su za određene lijekove prve generacije, u smislu njihove sigurnosti u trudnoći, ali novije tvari zahtijevaju daljnja ispitivanja da se proglase sigurnima u trudnoći. Svaki lijek upotrijebljen u trudnoći nosi rizik od teratogenosti i prije toga treba pažljivo procijeniti rizik / korist propisujući ih (16).

H1 antihistaminici koriste se za liječenje mučnina i povraćanja tijekom trudnoće koje se javljaju u otprilike 85 % trudnoća, kao i za simptomatsko olakšanje astme, urtikarije, alergija, prehlada i drugih stanja. H2 antihistaminici koriste se za liječenje probavnih smetnji i refluksa kiseline. Izloženost H1 antihistaminicima češća je tijekom prvog tromjesečja, dok je izlaganje H2 antihistaminicima češće nakon tog perioda (18). Prva generacija antagonista H1 receptora može proći BBB uzrokujući sedativne i antikolinergične nuspojave, dok druga generacija pak nema takve nuspojave (17). Bilo koji lijek korišten tijekom trudnoće ima potencijalan teratogeni učinak na fetus. Ako je lijek korišten u prvom tromjesečju, može uzrokovati strukturalne fetalne malformacije i u kasnijem dijelu trudnoće mogu uslijediti razni funkcionalni defekti ili poremećaji u rastu i slično. Stoga se u trudnoći nastoje izbjeći konzumacije bilo kakvih lijekova te liječnici važu prednosti u odnosu na potencijalne teratogene učinke prije korištenja bilo kojeg lijeka u trudnoći (16).

### 1.2.1. Bilastin

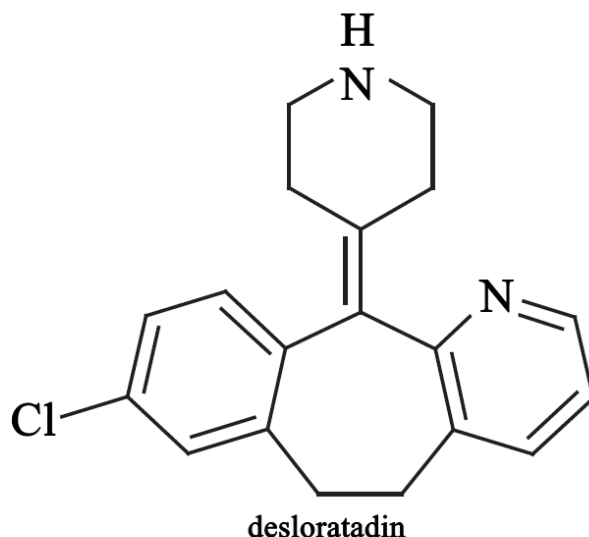
Bilastin je novi antagonist histaminskih receptora razvijen za liječenje simptoma alergijskog rinitisa i kronične idiopatske urtikarije (19, 20). Na temelju sposobnosti prelaska BBB pripada drugoj generaciji H1 antihistaminika koja uobičajeno ne može proći BBB, stoga ima slabije sedativne učinke. Dug period djelovanja, djelotvornost samog lijeka, niska sedacija i niska razina ometanja izvršavanja zadataka kod antihistaminika druge generacije, a posebice bilastina, čine ga potencijalno privlačnom terapijskom opcijom za alergologe (21). Farmakološka ispitivanja dokazala su da je bilastin vrlo selektivan za H1 receptore, a posjeduje i antihistaminička i protuupalna svojstva *in vitro* i *in vivo*. Nadalje, studije u zdravih dobrovoljaca pokazale su kako bilastin ima brz početak djelovanja (30-60 minuta) i dugo djelovanje (24 sata), nije podvrgnut niti jednom metabolizmu jetre te se uglavnom izlučuje stolicom (19). Ima srednje vrijeme polueliminacije od otprilike 12 do 14,5 sati. Prilagodba doze kod odraslih pacijenata s bubrežnom ili jetrenom disfunkcijom nije potrebna. Bilastin ne stupa u značajnu interakciju sa sustavom enzima CYP, stoga ovaj nedostatak, kao i nedostatak metabolizma u jetri, ograničavaju potencijalne interakcije između različitih lijekova (22). S molekularne točke gledišta, bilastin je 2-[4-(2-(4-(1-(2-etoksietil)-1Hbenzimidazol-2-il) piperidin-1-il) etil) fenil] -2-metil propionska kiselina. Pripada derivatima piperidina i nije strukturno izveden iz bilo kojeg drugog trenutno dostupnog antihistaminika (21). Za odrasle, bilastin se daje u pojedinačnoj dozi od 20 mg na dan te tako ne pokazuje nikakve znakove kardiotoksičnosti niti sedativne nuspojave. Također, poboljšava kvalitetu života pacijenata i ne umanjuje psihomotorne sposobnosti, a nedavno je odobren i za djecu u dobi od 6-11 godina (23, 24).



Slika 1. Prikaz strukture molekule bilastina (izradila autorica).

### 1.2.2. Desloratadin

Desloratadin je aktivni metabolit loratadina. Njegov antihistaminski učinak traje 24 sata (25, 26). Za široku primjenu u klinici desloratadin pokazuje prednosti u odnosu na druge H1 antihistaminike u tome što ima visoku H1 antihistaminsku aktivnost, širok terapijski raspon i mali potencijal za interakciju s drugim lijekovima. S druge strane, zabilježeno je da niska koncentracija desloratadina pokazuje sličan afinitet za histaminske H1 receptore i muskarinske receptore, što neizbježno može uzrokovati suhoću usta, vrtoglavicu, umor i slično, a može i izazvati sedativni učinak na pacijente sa kompromitiranom BBB (26). U ljudi, glavni *in vivo* metabolit desloratadina je 3-hidroksidesloratadin, koji se potom pretvara u 3-hidroksidesloratadin O-glukuronid. 3-hidroksidesloratadin i njegov glukuronid se u približno jednakim količinama izlučuju kroz urin i stolicu, dok su 5- i 6-hidroksidesloratadin maloznačni metaboliti u mokraći i stolici (27, 28). Stvaranje 3-hidroksidesloratadina uključuje tri uzastopne reakcije: 1) N-glukuronidaciju desloratadina pomoću UDP-glukuronosiltransferaze 2B10; 2) 3-hidroksilaciju desloratadina N-glukuronida pomoću CYP2C8 i 3) dekonjugaciju 3-hidroksidesloratadina N-glukuronida (brza neenzimatska hidroliza glukuronida) (28). Prema svojoj molekularnoj strukturi, desloratadin je 8-klor-6,11-dihidro-11-(4-piperidiniliden)-5H - Benzo [5,6] ciklohepta [1,2 - b] piridin nastao od loratadina pomoću CYP3A4 i CYP2D6. Odobren je za liječenje alergijskog rinitisa i kronične idiopatske urtikarije diljem svijeta. Otkriveno je kako svakodnevna primjena 5 mg desloratadina značajno poboljšava problem začepljenog nosa i ukočenosti kod pacijenata s intermitentnim alergijskim rinitisom u usporedbi s placebo. Također, studije su pokazale kako brzo smanjuje simptome višegodišnjeg alergijskog rinitisa s minimalnim štetnim učincima (29). No, postoje izvješća o depresiji ili depresivnom raspoloženju za koje se sumnja da su uzrokovani desloratadinom. Oznaka na američkim proizvodima opisuje da je u kliničkim ispitivanjima 3,1 % djece između 12 i 23 mjeseca starosti pokazalo osjećajnu nestabilnost nakon primanja desloratadina. Nuspojave sugeriraju da desloratadin može prijeći BBB, suprotno što se govori (30).



Slika 2. Prikaz strukture molekule desloratadina (izradila autorica).

### 1.2.3. Antihistaminici u trudnoći i urođene mane

Antihistaminici se mogu koristiti za ublažavanje alergijskog rinitisa, infekcija gornjih dišnih putova, kao i za liječenje simptoma trudnoće kao što su mučnina, povraćanje, vrtoglavica, nesanicu i drugi. Upotreba antihistaminika tijekom trudnoće kreće se od 4 do 10 % tijekom prvog tromjesečja i od 8 do 15 % u bilo kojem trenutku tijekom trudnoće. Nekoliko je studija ukazalo na povezanost između majčine uporabe nekih antihistaminika tijekom ranih mjeseci trudnoće i nekih urođenih mana. Tako su zabilježeni slučajevi hipospadije kod korištenja loratadina u ranoj trudnoći (31). S druge strane, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) napravio je veliku studiju prevencije urođenih oštećenja te je prva objavljena studija istražila povezanost između hipospadije i izloženosti loratadinu. Pokazano je kako nema povezanosti između loratadina i hipospadije kod muške dojenčadi (32). Također, *Suradnički perinatalni projekt* pokazao je kako nema povećanog rizika za velike urođene malformacije nakon majčine uporabe bilo kojeg antihistaminika (doksilamin, klorfeniramin ili feniramin), no među svim skupinama izloženosti i skupinama malformacija jedan je dosegao statističku značajnost: klorfeniramin i malformacije oka i uha (33). Dva su glavna ograničenja koja otežavaju mnoga istraživanja: mala veličina uzorka (tj. neadekvatna snaga, posebno za bitne analize podgrupa) i rizik od pristranosti zbog pogrešne klasifikacije izloženosti zbog oslanjanja na podatke u receptu lijeka. Stoga su potrebne velike i dugogodišnje studije koje će proučavati povezanost urođenih mana s korištenjem lijekova (34).



### 1.3. Glijalni fibrilarni kiseli protein

Glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) citoskeletalni je protein iz skupine intermedijarnih filamenata. Nitaste je strukture i specifičan za stanični kostur zrelih astrocita, najzastupljenije vrste glija stanica CNS-a (35). Astrociti imaju niz kontrolnih i homeostatskih funkcija u zdravlju i bolesti te predstavljaju reaktivni fenotip kod akutnih trauma CNS-a, ishemije i neurodegenerativnih bolesti. GFAP igra bitnu ulogu u migraciji i pokretljivosti stanica, u sidrenju glutamatskog transportera GLAST/EAAT1 u membrani i u mitozu (36). Služi i za održavanje mehaničke čvrstoće, pružanje potpore susjednim neuronima i održavanje BBB (37). Također, on je astroglijalni biomarker ozljede. Izvrsno detektira i intrakranijalne lezije u pacijenata s blagom traumatskom ozljedom mozga koji imaju značajne ekstrakranijalne ozljede i prijelome te otkriva ozljedu aksona na magnetskoj rezonanci i 3 mjeseca nakon traumatske ozljede mozga (38).

### 1.4. Neuronski jezgrin protein

Neuronski jezgrin protein (engl. *neuronal nuclear protein*, NeuN) smješten je u jezgri zrelih neurona i perinuklearnoj citoplazmi većine neurona u CNS-u sisavaca. Nalazi se isključivo u živčanom tkivu te je specifični neuronski marker jer nikada nije detektiran u glijalnim stanicama (39). Široko je priznati biomarker koji se detektira u post-mitotskim neuronima te je rasprostranjen u gotovo svim dijelovima živčanog sustava kralježnjaka (40). Antitijela na NeuN aktivno se koriste u imunohistokemijskim istraživanjima neuronske diferencijacije kako bi se procijenila funkcionalnost neurona u normalnim i patološkim stanjima. Nivo ekspresije NeuN-a koristi se kako bi se direktno procijenio gubitak ili smrt neurona (39, 40).

### 1.5. Neuroplastin 65

Gen za neuroplastin kodira dvije izoforme sinaptičkog proteina, neuroplastin 55 (engl. *neuroplastin 55*, Np55) i neuroplastin 65 (engl. *neuroplastin 65*, Np65). Ovi su proteini transmembranski glikoproteini koji reguliraju nekoliko staničnih procesa, uključujući nastanak, održavanje i plastičnost sinapsi (41). Np65 je specifičan glikoprotein sinaptičke membrane mozga, koji je pretežno smješten u dijelovima mozga koji su povezani s pamćenjem i procesiranjem emocija kao što su frontalna kora, amigdala, striatum te hipokampus (42, 43). Gen za ovaj protein nalazi se na 15. kromosomu (15q24) te ima 12 egzona i 4 konzervirane

domene (tri imunoglobulinske domene i jednu unutarstaničnu C-terminalnu domenu). Np65 je u genetičkoj podlozi inteligencije kod ljudi, a funkcija mu je povezana sa staničnom adhezijom i neuronskom komunikacijom. Također, aktivira kinazu p38, a interakcija između Np65 i kinaze p38 podešava sinaptičku snagu, dok kinaza p38 pomaže matičnim stanicama da se diferenciraju u neurone (44). Pronađene su bitne razlike u ekspresiji neuroplastina između glodavaca i čovjeka. Kod ljudi, neuroplastin se nalazi i u malom mozgu u somi stanice, neuritima i neuropilu i to pretežno Np65 izoforma, dok u malom mozgu glodavaca prevladava Np55 (45).

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da antihistaminici desloratadin i bilastin djeluju na razvoj neurona i glije u mozgu embrija Sprague Dawley štakora, kao i na sinaptogenezu te izražaj H1 receptora.

### **3. CILJEVI**

Cilj studije je usporediti tri skupine mladunaca porijeklom od netretiranih majki ili majki tretiranih antihistaminicima s obzirom na izražaj H1 receptora, markere neurona i glije te neuroplastin kao marker sinaptogeneze.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Studija je ustrojena kao istraživanje parova – životinje tretirane antihistaminicima u odnosu na životinje netretirane istim.

### **4.2. Materijali**

Studija je načinjena na arhivi tkiva prikupljenog RECOOP projektom voditeljice Vedrane Ivić koju je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta u Szegedu, br. IV/3796/2015 te Etičko povjerenstvo za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/20-08/07; Broj: 2158-61-07-20-45; dana 15. svibnja 2020.). U studiju je uključeno 36 životinja starosti 3 mjeseca. Životinje su podijeljene u 3 skupine: 1. potomci netretiranih Sprague Dawley štakorica (kontrola), 2. potomci štakorica tretiranih desloratadinom, 3. potomci štakorica tretiranih bilastinom. U svakoj skupini nalazi se po 6 mužjaka i 6 ženki starosti 3 mjeseca. Prikupljena moždana tkiva fiksirana su otopinom 4 %-tnog paraformaldehida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) na 24 sata, te krioprotektirana u otopinama saharoze udjela od 10 do 30 % (u fosfatnom puferu - engl. *phosphate buffered saline*, PBS) također u trajanju od 24 sata za svaku primijenjenu otopinu. Naposljetku, tkiva su pohranjena u zamrzivač na - 80 °C do daljnjeg postupanja.

### **4.3. Metode**

Uzorci tkiva mozga iz arhive izrezani su u koronarnom smjeru na kriostatu (Leica CM3050 S, Wetzlar, Njemačka) na debljinu 35 µm te su preparati do daljnje obrade pohranjeni u otopini po de Olmoshu (otopini za krioprotekciju) na 4 °C (46). Dio rezova ispran je PBS-om i navučen na predmetna stakla presvučena želatinom te su preparati osušeni preko noći na sobnoj temperaturi. Potom su obojeni histološkom bojom krezil violet (bojanje po Nisslu; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, kat. br.: 860980-5G) kojom se dobiva prikaz svih jezgara u mozgu te tako razaznaju slojevi mozga. Imunohistokemijom na slobodno plutajućim rezovima, uz pomoć visokospecifičnih protutijela na H1 receptor, neuronski jezgrin protein (NeuN, marker neurona), glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP, marker glije) te neuroplastin 65 (molekula stanične adhezije, marker sinaptogeneze), prikazani su navedeni epitopi u tkivu mozga. Obojana tkiva nanosena su na predmetna stakla te pokrivena medijem za pokrivanje

(BioMount DPX, Biognost, Hrvatska, kat. br.: BM-500) i pokrovnim stakalcem. Dio preparata potom je fotografiran pod lupom pomoću fotoaparata (lupa SZX12, Japan; Canon EOS 2000D, Tokio, Japan) na ukupnom povećanju od  $11,2\times$  te  $100\times$ , a dio je fotografiran kamerom Olympus DP-70 spojenom s mikroskopom (Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) pri povećanju objektivna  $20\times$ . Korištenjem računalnog programa ImageJ v.1.80 s njegovim FIJI dodatkom (engl. *plugin*) kvantificirana su obojenja navedenih epitopa.

#### **4.3.1. Bojenje po Nisslu**

Korišteni su rezovi koji su prethodno navučeni na predmetna stakla te ostavljeni na sobnoj temperaturi da se osuše preko noći. Inkubirani su u trajanju od deset minuta u radnoj otopini krezil violet boje (Kemika, Hrvatska) koju smo pripremili iz matične otopine (5 %-tna otopina krezil violet boje u 20 %-tnoj otopini etanola) u omjeru 1:4 (1 dio matične otopine, 4 dijela 20 %-tnog etanola) uz dodatak ledene octene kiseline (40 ml na 120 ml radne otopine) (47). Po isteku vremena inkubacije, rezovi su dehidrirani uranjanjem pet puta u niz otopina etanola različitih udjela sljedećim redoslijedom: 96 %-tni etanol te dva puta 100 %-tni etanol. Uslijedilo je uranjanje dva puta po pet minuta u ksilen (Carlo Erba Reagents, Francuska, kat. br.: 492301) te potom pokrivanje medijem za pokrivanje i pokrovnica.

#### **4.3.2. Imunohistokemijske metode**

Rezovi su izvađeni iz otopine po de Olmoshu, isprani tri puta u  $1\times$  PBS-u (pH 7,4; 137 mM NaCl (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska; kat. br. P148590), 2,7 mM KCl (VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD; kat. br. 26764.260), 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska; kat. br. P143710), 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD; kat. br. P3786-100G)) te stavljeni u predtretman 1 %-tnim vodikovim peroksidom (Kemika, Zagreb) dva puta po dvadeset minuta kako bi zasitili aktivna mjesta endogenih peroksidaza. Zatim su prebačeni u blokirajuću otopinu i inkubirani tijekom dva sata na  $4\text{ }^\circ\text{C}$  uz konstantno miješanje da se blokiraju sve nespecifične reakcije. Blokirajuća otopina bila je 1 % BSA (engl. *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 5 %-tni kozji serum (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) pripremljeni u  $1\times$  PBS-u. Potom su rezovi prebačeni u otopinu primarnog protutijela pripremljenog u otopini za blokiranje. Uslijedila je inkubacija preko noći na tresilici, na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Rezovi su zatim isprani tri puta po deset minuta u  $1\times$  PBS-u te prebačeni u otopinu sekundarnog protutijela razrijeđenog u blokirajućoj otopini. Inkubirani su tijekom četiri sata na  $4\text{ }^\circ\text{C}$  na tresilici. Potom su isprani tri puta po deset minuta u  $1\times$  PBS-u te stavljeni u otopinu tercijarnog kompleksa (1:250 avidin i 1:250 biotin-HRP u  $1\times$

PBS-u, Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) na 4 °C uz neprekidno miješanje, tijekom dva sata. Usljedilo je ispiranje tri puta po deset minuta u 1× PBS-u te razvijanje u otopini diaminobenzidina (DAB, engl. *3,3'-diaminobenzidine*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) priređenoj prema uputama proizvođača. Preparati su zatim navučeni na predmetna stakla i ostavljeni da se osuše. Pokriveni su medijem za pokrivanje i pokrovnim stakalcem.

Tablica 1. Popis korištenih protutijela.

OZNAKA	Primarno protutijelo (proizvođač i razrjeđenje)	Sekundarno protutijelo (proizvođač i razrjeđenje)	Vrijeme razvijanja u otopini diaminobenzidina
<b>H1R</b>	protu-H1R (Alomone labs, Izrael, kat. br.: AHR-001; 1:300)	biotinilirano protu-zečje IgG protutijelo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD, kat. br.: BA 1000; 1:500)	3 min
<b>NeuN</b>	protu-NeuN (Millipore, Temecula, CA, SAD, kat. br.: MAB377; 1:1000)	biotinilirano kozje protu-mišje IgG protutijelo (Santa Cruz Biotechnology, Texas, SAD, kat. br.: SC-2039; 1:500)	1 min
<b>GFAP</b>	protu-GFAP (Dako, Santa Clara, CA, SAD, kat. br.: Z0334; 1:4000)	biotinilirano protu-zečje IgG protutijelo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD, kat. br.: BA 1000; 1:500)	1 min
<b>Np65</b>	protu-Np65 (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD, kat. br.: AF5360; 1:300)	sekundarno biotinilirano magareće protu-kozje IgG protutijelo (Abcam, Cambridge, UK, kat. br.: ab6884; 1:500)	1 min

GFAP – glijalni fibrilarni kiseli protein, H1R – histaminski receptor 1, NeuN – neuronski jezgrin protein, Np65 – neuroplastin 65.

#### 4.4. Računalna analiza histoloških i imunohistokemijskih rezultata

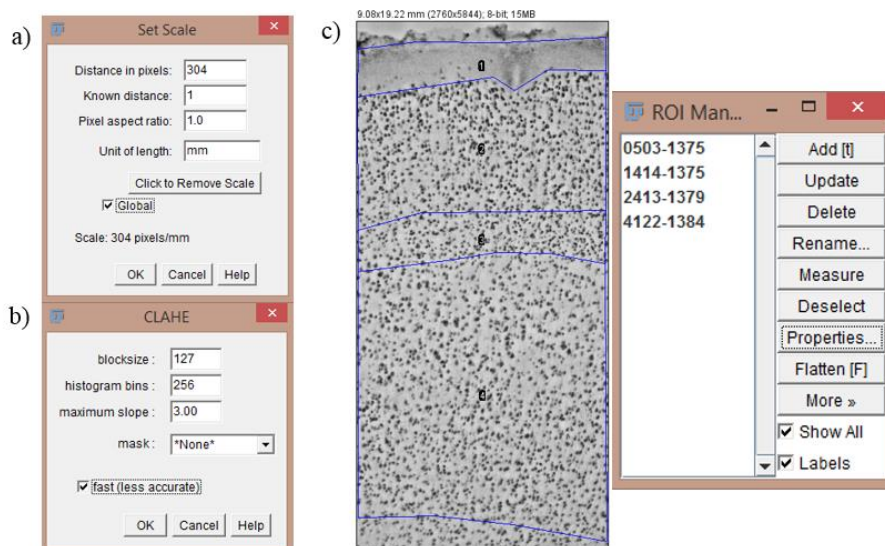
##### 4.4.1. Analiza debljine slojeva moždane kore u slušnoj i motoričkoj regiji

Analiza histoloških preparata obojenih po Nisslu napravljena je u programu ImageJ prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Kalibrirati sliku tako da se u alatnoj traci odabere naredba *Straight line* (ravna linija) i preko cijele dužine mjerne skale sa slike povuče ravna linija. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost koju predstavlja skala = 304 piksela), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u milimetrima koju predstavlja skala = 1 mm), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1) i mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = mm). Kako bi program primijenio kalibraciju na sve slike koje će se analizirati potrebno je odabrati naredbu *Global* (Slika 3a).
3. Sliku prevesti u 8-bitni oblik pomoću alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
4. Zatim pojačati lokalni kontrast koristeći naredbu *Process* → *CLAHE* (Slika 3b).
5. Izdvojiti moždano područje od interesa tako što se na alatnoj traci odabere *Rectangle* (pravokutnik), označiti Au1/M1 područje i duplicirati pomoću *Image* → *Duplicate* te potom imenovati novonastalu sliku.
6. Na traci odabrati naredbu *Analyze* → *Tools* → *ROI manager* i pomoću *Polygon* (mnogokut) alata odrediti slojeve u odabranom području mozga. Označiti sloj 1 → *add ROI*, isto tako ponoviti sa slojevima 2/3, 4 i 5/6 (Slika 3c). Kliknuti naredbu *Measure* (izmjeri) i prenijeti dobivene podatke u Excel.

Isti protokol primijenjen je na obje analizirane regije kore mozga: slušnu (Au1) i motoričku (M1) primarnu koru.





Slika 3. Analiza debljine slojeva moždane kore u slušnoj i motoričkoj regiji kore mozga, koraci 1-6. a) Kalibracija slike, b) pojačavanje lokalnog kontrasta, c) analiza slojeva korištenjem *ROI manager* naredbe.

#### 4.4.2. Prebrojavanje stanica nakon imunohistokemijskog bojenja

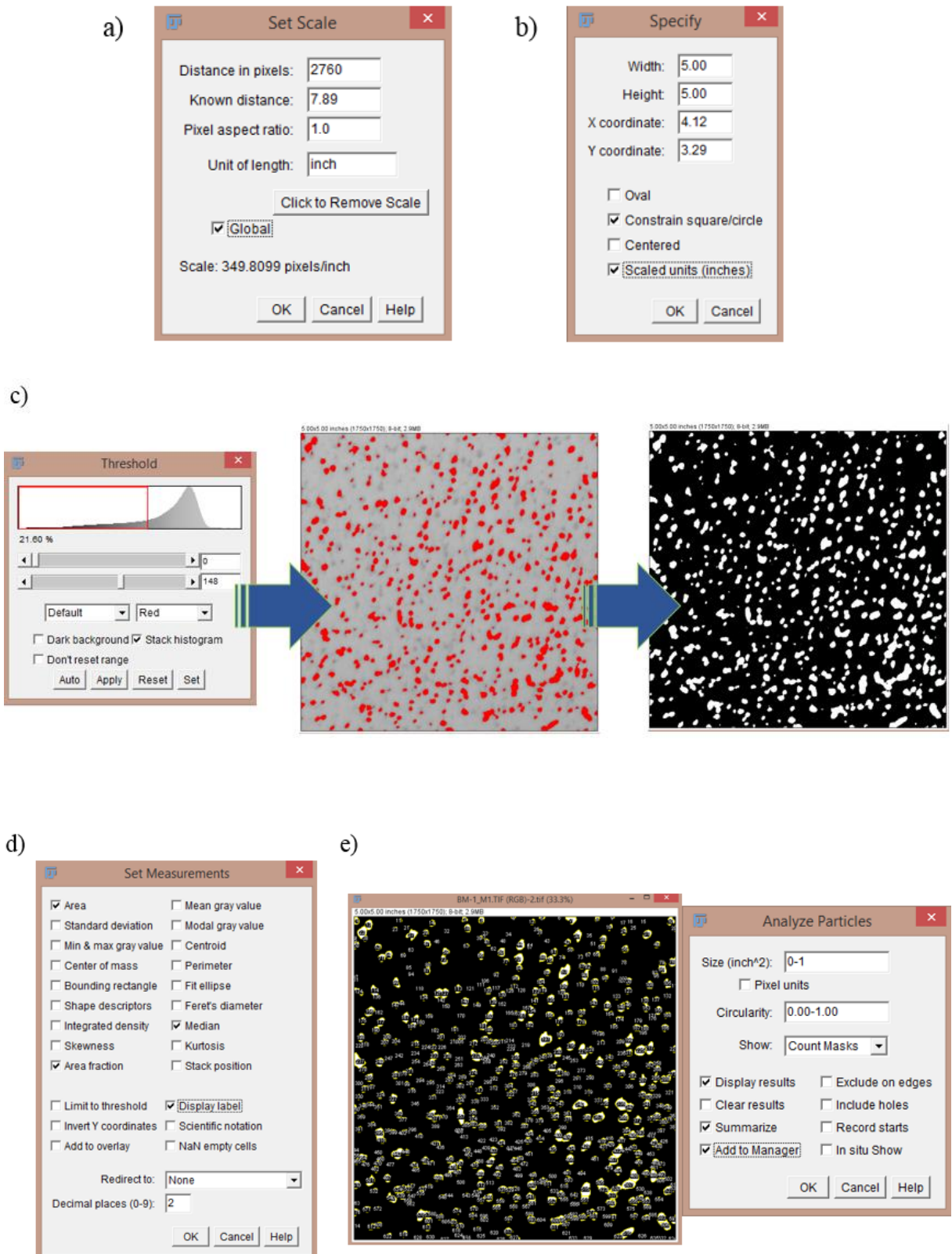
Imunohistokemijskim metodama odvojeno su prikazani neuroni i glija stanice. Kako smo kod bojenja neurona upotrijebili epitop za protein smješten u jezgri, a kod bojenja glija stanica citoplazmatski epitop specifičan za citoskelet – protokoli analize se međusobno razlikuju pa su zasebno objašnjeni.

#### Analiza broja neurona

Broj neurona određen je kvantifikacijom NeuN pozitivnih jezgara prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Kalibrirati sliku tako da se u alatnoj traci odabere naredba *Straight line* (ravna linija) i preko cijele dužine mjerne skale sa slike povuče ravna linija. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost koju predstavlja skala = 2760 piksela), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u inčima koju predstavlja skala = 7.89 inč), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1) i mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = inč). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve slike koje će se analizirati potrebno je odabrati naredbu *Global* (Slika 4a).
3. Slika koja se analizira je *stack* (kombinacija) triju kanala (crveni, zeleni i plavi), odnosno slika je troslojna. Potrebno ju je prevesti u samo jedan sloj naredbom *Image* → *Type* → *RGB color* nakon čega se otvori novi prozor s jednoslojnom slikom.

4. Zatim nacrtati pravokutnik ili kvadrat pomoću *Rectangle* (pravokutnik) alata pa specificirati površinu 5x5 inča koristeći naredbu *Edit* → *Selection* → *Specify*. U polja *width* i *height* upisati 5 te označiti kvačicom *constrain square/circle* i *scaled units* (Slika 4b).
5. Naredbom *Image* → *Duplicate* dobije se odabrana površina za mjerenje u novom prozoru.
6. Sliku prevesti u 8-bitni oblik pomoću alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
7. Ukloniti pozadinske šumove preko izbornika *Process* → *Noise* → *Despeckle*.
8. Prilagoditi prag naredbom *Image* → *Adjust* → *Threshold* tako da se prva klizeća traka postavi na 0, a druga na 148 te se odabere *Apply*. Tako se dobije negativ slike gdje su neuroni bijele boje, a ostatak slike crne boje (Slika 4c).
9. Na traci odabrati naredbu *Process* → *Binary* → *Watershed* kako bi program višestaničnu česticu razdvojio na nekoliko čestica (stanica).
10. Zatim postaviti parametre za kvantifikaciju koristeći *Analyze* → *Set Measurements* (Slika 4d) te analizirati stanice naredbom *Analyze* → *Analyze Particles* (Slika 4e).
11. Dobivene podatke prenijeti u Excel.

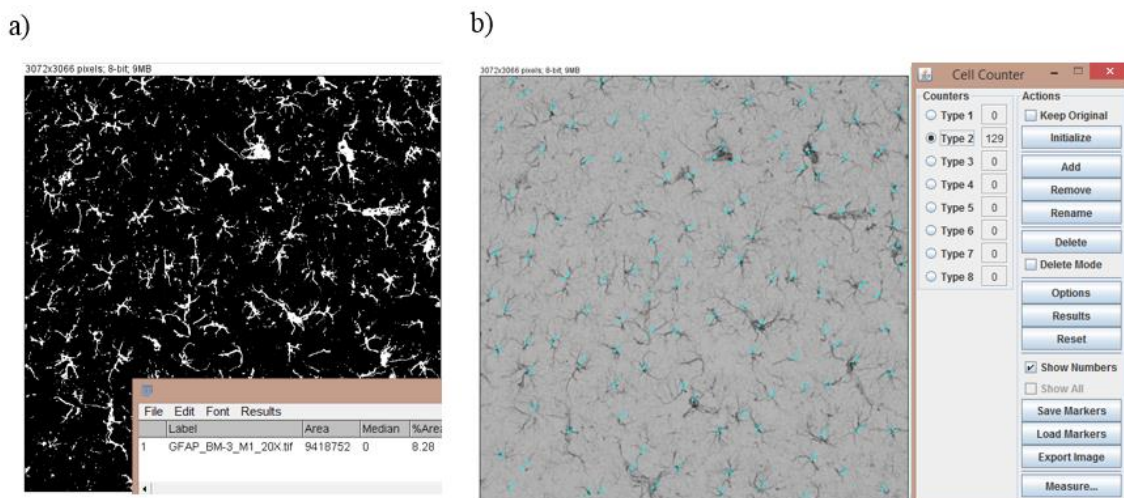


Slika 4. Prebrojavanje neurona u slušnoj i motoričkoj regiji kore mozga, koraci 1-11. a) Kalibracija slike, b) specificiranje površine, c) prilagođavanje praga naredbom *Threshold*, d) postavljanje parametara za kvantifikaciju, e) analiza broja stanica.

## Broj glija stanica

Broj glija stanica određen je kvantifikacijom GFAP pozitivnih stanica prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti sliku korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željenu sliku.
2. Kalibrirati sliku tako da se u alatnoj traci odabere naredba *Straight line* (ravna linija) i preko cijele dužine mjerne skale sa slike povuče ravna linija. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost koju predstavlja skala = 2760 piksela), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u inčima koju predstavlja skala = 7.89 inč), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1) i mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* = inč). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve slike koje će se analizirati potrebno je odabrati naredbu *Global*.
3. Sliku prevesti u 8-bitni oblik pomoću alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
4. Zatim ukloniti pozadinske šumove naredbom *Process* → *Noise* → *Despeckle*.
5. Konvertirati sliku u binarni oblik tako da se na alatnoj traci odabere *Process* → *Binary* → *Make Binary*. Tako se dobije slika crne pozadine gdje su glija stanice bijele boje (Slika 5a).
6. Kliknuti naredbu *Measure* (izmjeri) i prenijeti dobivene podatke u Excel.
7. Potom otvoriti 8-bitnu sliku i putem naredbe *Plugins* → *Analyze* → *Cell Counter* i odabira tipa brojača pokrenuti brojenje stanica klikom na *initialize* (počni). Označavati glija stanice sve dok se ne dođe do zadnje (Slika 5b).
8. U Excel unijeti ukupan broj iz brojača stanica.

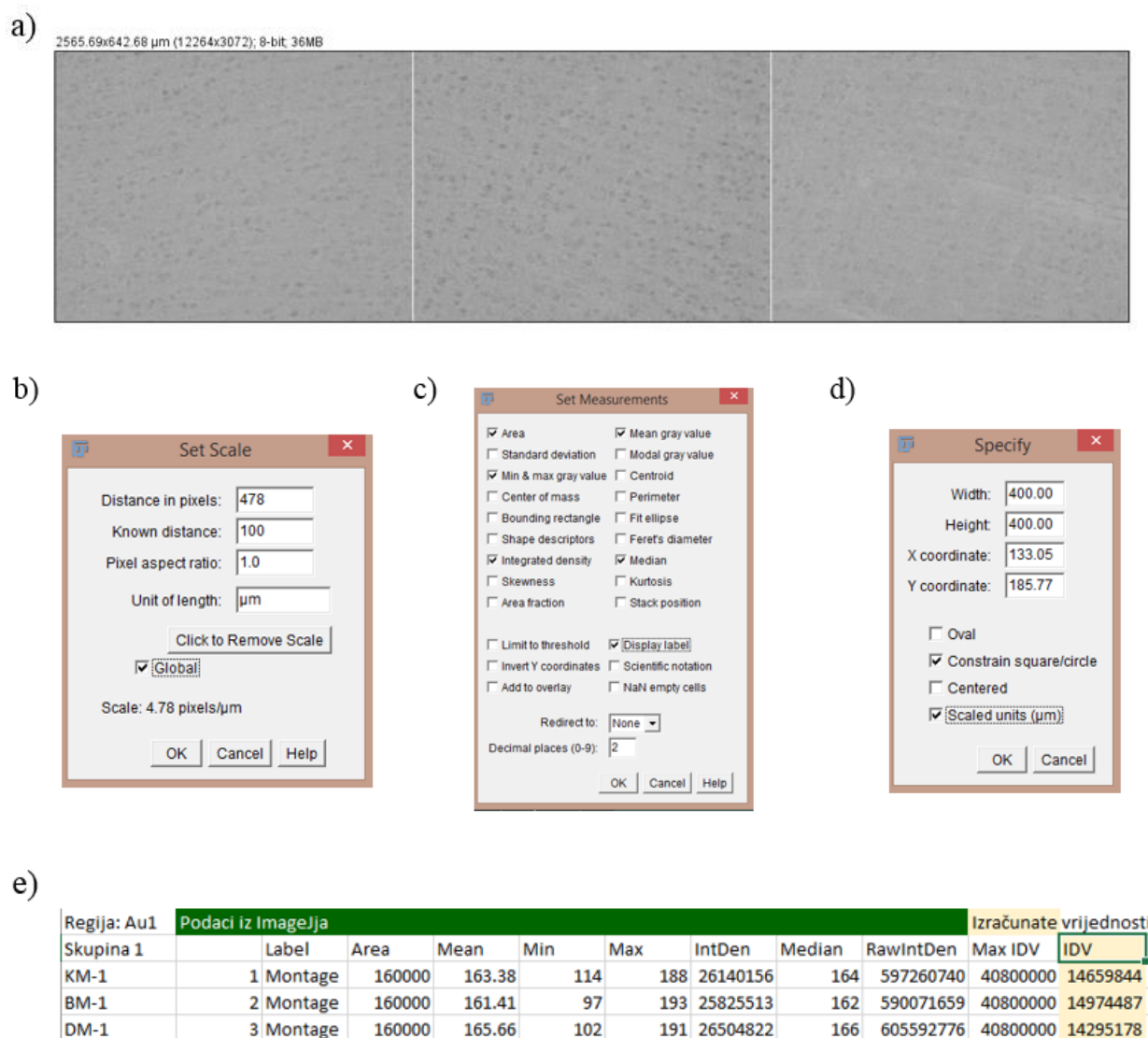


Slika 5. Prebrojavanje stanica glije u slušnoj i motoričkoj regiji kore mozga, koraci 1-8. a) Konvertiranje slike u binarni oblik, b) prebrojavanje glija stanica pomoću brojača.

#### 4.4.3. Analiza izražaja staničnih proteina

Izražaj proteina H1R i Np65 kvantificiran je u određenoj površini kore mozga prema sljedećem protokolu:

1. Otvoriti slike korištenjem alatne trake izbornika *File* → *Open* → odabrati željene slike (prvo kontrolna skupina, zatim bilastin pa desloratadin).
2. Napraviti *stack* (kombinacija) od slika odabirom naredbe na alatnoj traci *Image* → *Stacks* → *Images to Stack*
3. Slike prevesti u 8-bitni oblik pomoću alatne trake izbornika *Image* → *Type* → *8-bit*.
4. Od *stack*-a slika napraviti montažu tako da se odabere *Image* → *Stack* → *Make Montage* (s lijeva na desno su poredane skupine kako su se otvarale slike : 1. kontrola, 2. bilastin i 3. desloratadin) (Slika 6a).
5. Kalibrirati sliku tako da se u alatnoj traci odabere naredba *Straight line* (ravna linija) i preko cijele dužine mjerne skale sa slike povuče ravna linija. U izborniku *Analyze* → *Set scale* potrebno je unijeti udaljenost u pikselima (*Distance in pixels*, udaljenost koju predstavlja skala = 478 piksela), poznatu udaljenost (*Known distance*, udaljenost u inčima koju predstavlja skala = 100  $\mu\text{m}$ ), omjer piksela (*Pixel aspect ratio* = 1) i mjernu jedinicu dužine (*Unit of length* =  $\mu\text{m}$ ). Kako bi program primijenio opisanu kalibraciju na sve slike koje će se analizirati potrebno je odabrati naredbu *Global* (Slika 6b).
6. Zatim odrediti izlazne informacije mjerenja naredbom *Analyze* → *Set Measurements* (Slika 6c).
7. Nacrtati ROI na jednoj slici koristeći se *Rectangle* (pravokutnik) alatom tako da se nacrtava pravokutnik ili kvadrat, specificira mu se površina primjenom naredbe *Edit* → *Selection* → *Specify*. Površina koja se analizira iznosi  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$  (Slika 6d).
8. Kliknuti naredbu *Analyze* → *Measure* i dobivene podatke prenijeti u Excel. Iz dobivenog mjerenja računati integralnu gustoću obojenja (engl. *Integrated Density Value*, IDV), odnosno koliko sivog pripada imunopozitivnoj reakciji, tako da se od najveće moguće vrijednosti svakog piksela u analiziranoj površini ( $\text{Max IDV} = 255 \cdot \text{Area}$ ) oduzme *IntDen* (*Integrated Density*) vrijednost (Slika 6e).



Slika 6. Analiza izražaja staničnih proteina, koraci 1-8. a) Montaža slika, b) kalibracija slike, c) postavljanje mjerenja, d) specifikacija površine pravokutnika, e) računanje vrijednosti integralne gustoće obojenja (IDV).

#### 4.5. Statističke metode

Kategorijski podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Da bi utvrdili kako spol jedinke i intrauterini tretman utječu na kvantificirane slojeve moždane kore i epitope, u slučaju normalne raspodjele podaci su analizirani dvosmjernim ANOVA testom, a u slučaju odstupanja

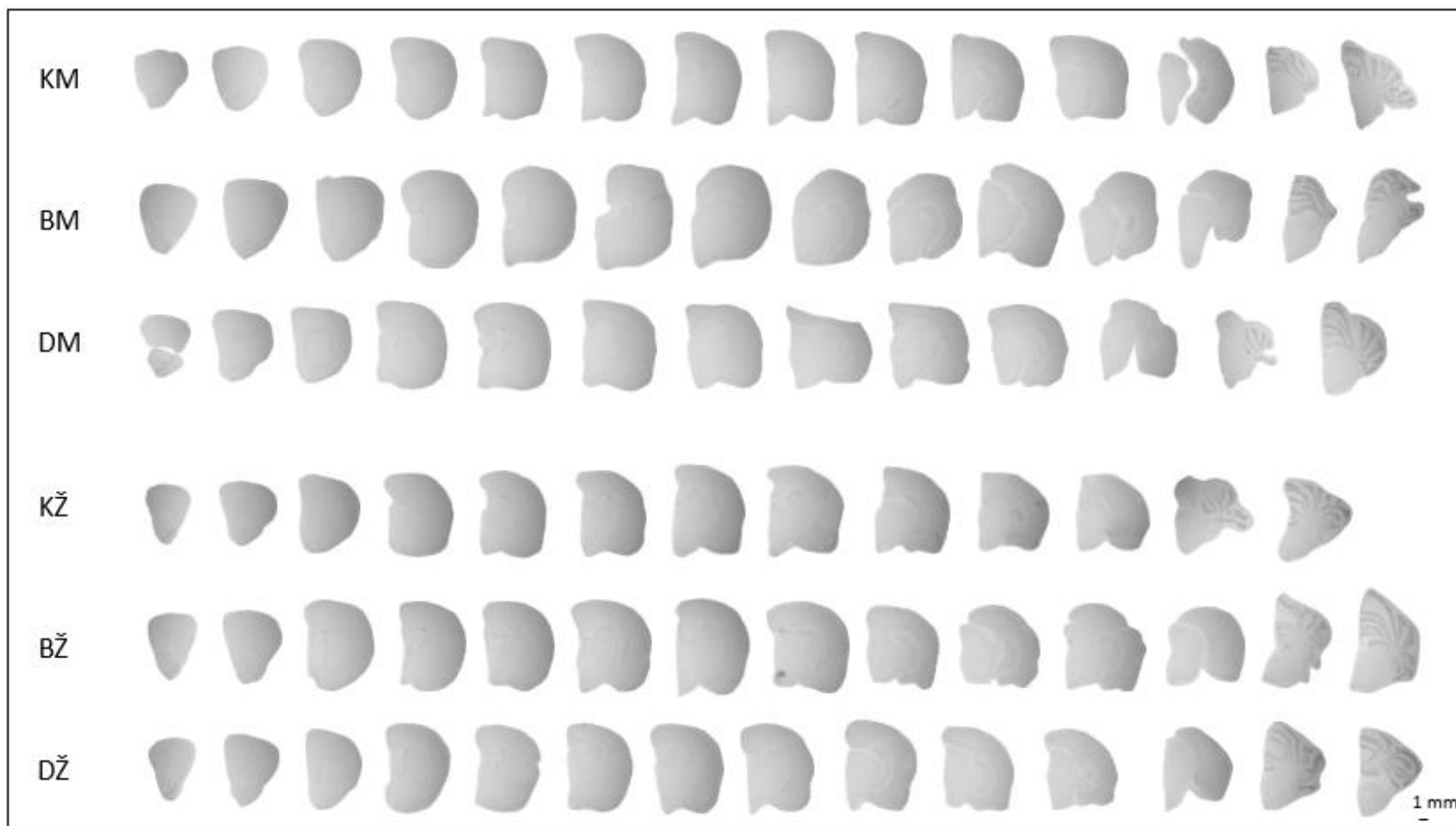
od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U-testom. Za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata odabrana je razina značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Statistička analiza obrađena je u programu Past 4.03 (Oyvind Hammer, Oslo, Norveška).

## **5. REZULTATI**

### **5.1. Analiza anatomije mozga**

Na temelju histološkog bojenja po Nisslu izradili smo prikaze anatomije mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora (Slika 7). Iz navedenih prikaza vidljivo je da je došlo do promjena u hipokampusu kod skupina koje su intrauterino tretirane antihistaminicima bilastinom i desloratadinom. Naime, područje hipokampusa kontrolnih skupina ima zaglađen oblik, dok se kod tretiranih skupina primjećuje „nabranost“ hipokampusa (Slika 7).





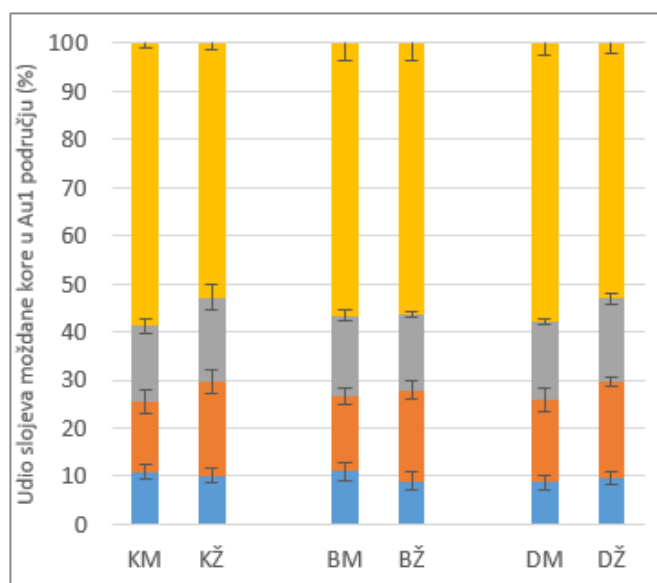
Slika 7. Prikazi anatomije kora mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Povećanje 7×. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

## 5.2. Analiza debljine slojeva moždane kore u slušnoj i motoričkoj kori mozga

Na temelju histološkog bojenja po Nisslu i imunohistokemijskog bojenja neuronskog jezgrinog proteina (NeuN) određeni su sljedeći slojevi moždane kore u primarnom slušnom (Au1) i primarnom motoričkom (M1) području kore mozga: sloj 1, slojevi 2 i 3, sloj 4 te slojevi 5 i 6. Izmjerena je njihova debljina i izračunat udio u analiziranom području moždane kore kako bi se utvrdilo na koji način spol jedinke i intrauterini tretman antihistaminicima djeluju na udio slojeva moždane kore u navedenim područjima.

### Analiza debljine slojeva u primarnoj slušnoj kori mozga

Analiza debljine slojeva moždane kore u primarnoj slušnoj kori mozga Sprague Dawley štakora pokazala je kako nema statistički značajnih učinaka na udio sloja 1 u Au1 području kore. Nadalje, pokazalo se kako je učinak spola na udio slojeva 2 i 3 u Au1 području moždane kore statistički značajan  $F_{(1,17)} = 14,45$ ,  $p = 0,003$ . Skupine ženki imale su veći udio slojeva 2 i 3 u odnosu na skupine mužjaka (Slika 8). Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni u ovim slojevima. Također, nema statistički značajnih učinaka na udio sloja 4 u Au1 području moždane kore. Daljnjom analizom pokazalo se kako je učinak spola na udio slojeva 5 i 6 u Au1 području moždane kore statistički značajan  $F_{(1,17)} = 8,653$ ,  $p = 0,012$ . Skupine mužjaka imale su veći udio slojeva 5 i 6 u odnosu na skupine ženki (Slika 8). Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.

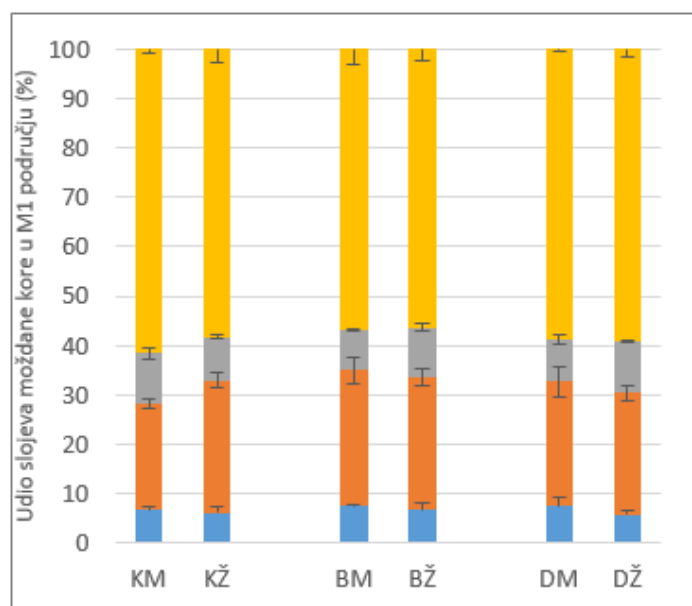


Slika 8. Analiza debljine slojeva moždane kore u primarnoj slušnoj kori mozga (Au1) mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora na temelju imunohistokemijskog bojenja neuronskog jezgrinog

proteina. Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, KM – kontrolna skupina mušjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Analiza debljine slojeva u primarnoj motoričkoj kori mozga

Analizom slojeva moždane kore u primarnoj motoričkoj (M1) kori mozga Sprague Dawley štakora dvosmjerni ANOVA test otkrio je kako na udio slojeva 1, 2 i 3 nema statistički značajnih učinaka. Daljnjom analizom pokazalo se kako je interakcija intrauterinog tretmana i spola jedinice statistički značajno utjecala na udio sloja 4 u M1 području moždane kore  $F_{(2,17)} = 11,38$ ,  $p = 0,002$ . *Post hoc* test otkriva da su mušjaci iz skupine B imali statistički značajno manji udio sloja 4 u M1 području moždane kore u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,021$ ). Također, ista skupina mušjaka imala je statistički značajno manji udio sloja 4 u odnosu na skupinu B ženki ( $p = 0,035$ ) (Slika 9). Učinci tretmana i spola nisu bili značajni u ovom sloju. Učinak tretmana na udio slojeva 5 i 6 u M1 području moždane kore pokazao je statističku značajnost  $F_{(2,17)} = 4,022$ ,  $p = 0,046$ . *Post hoc* test otkriva da je skupina B imala statistički značajno manji udio slojeva 5 i 6 u M1 području moždane kore u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,043$ ) (Slika 9). Učinci spola te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.



Slika 9. Analiza debljine slojeva moždane kore u primarnoj motoričkoj kori mozga (M1) mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora na temelju imunohistokemijskog bojenja neuronskog

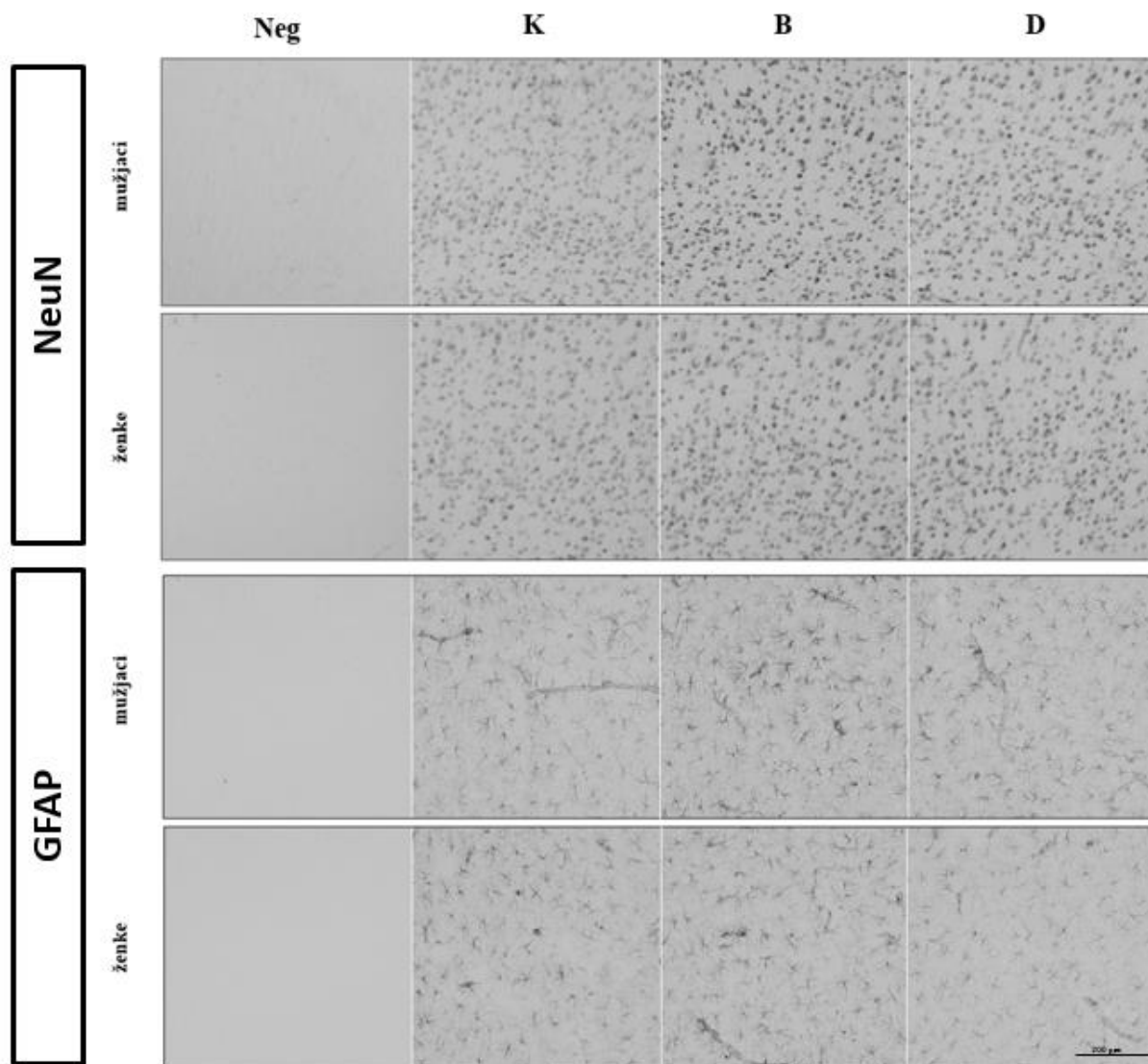
jezgrinog proteina. Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### **5.3. Usporedba omjera neurona i astroglije u slušnoj i motoričkoj kori mozga eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu**

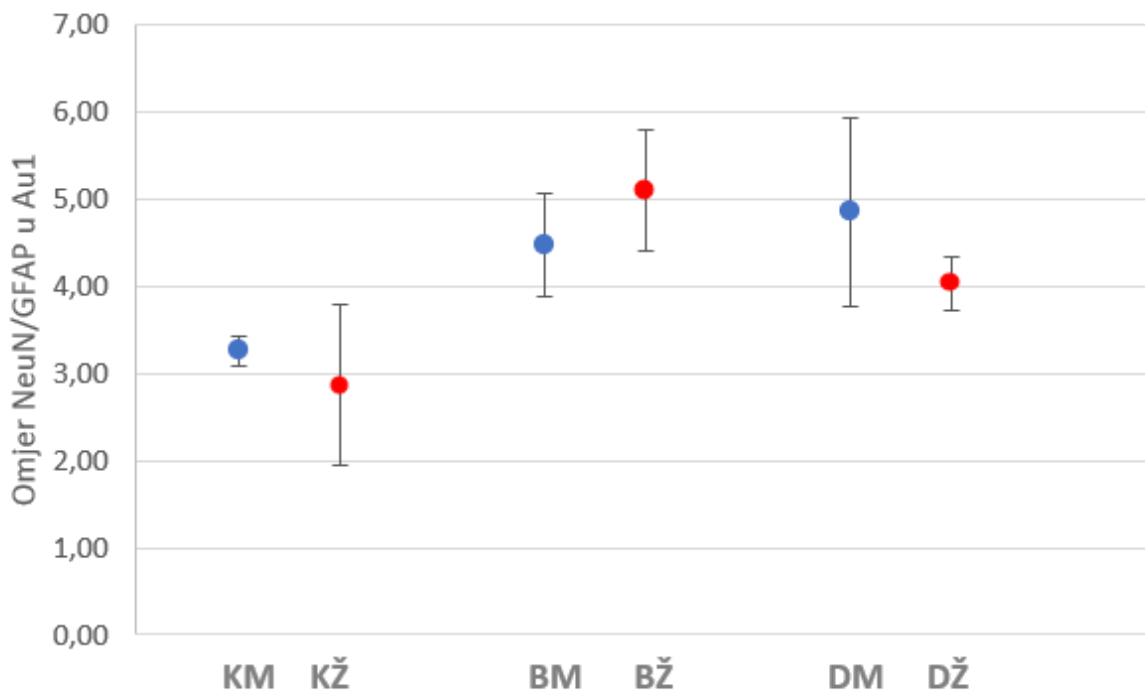
Tijela neurona vizualizirana su imunohistokemijskim bojenjem NeuN-a, a astroglija imunohistokemijskim bojenjem GFAP-a. Sve imunopozitivne stanice u Au1 i M1 područjima moždane kore prebrojane su te je izračunat omjer neurona i astroglije kako bi se utvrdilo na koji način spol jedinke i intrauterini tretman antihistaminicima djeluju na omjer neurona i glije u navedenim područjima.

#### **Usporedba omjera neurona i glije u Au1 području**

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na NeuN i GFAP (Slika 10) provedena je analiza dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala kako samo tretman antihistaminicima izaziva statistički značajne učinke  $F_{(2,17)} = 10,16$ ,  $p = 0,003$ , dok spol te interakcija spola i tretmana nisu bili statistički značajni (Slika 11). Detaljnijom analizom pomoću Tukeyjevog *post hoc* testa otkrili smo da, kada se uspoređi s kontrolnom skupinom, i bilastin ( $p = 0,003$ ) i desloratadin ( $p = 0,013$ ) izazivaju povećanje omjera neurona i glije u Au1 području moždane kore.



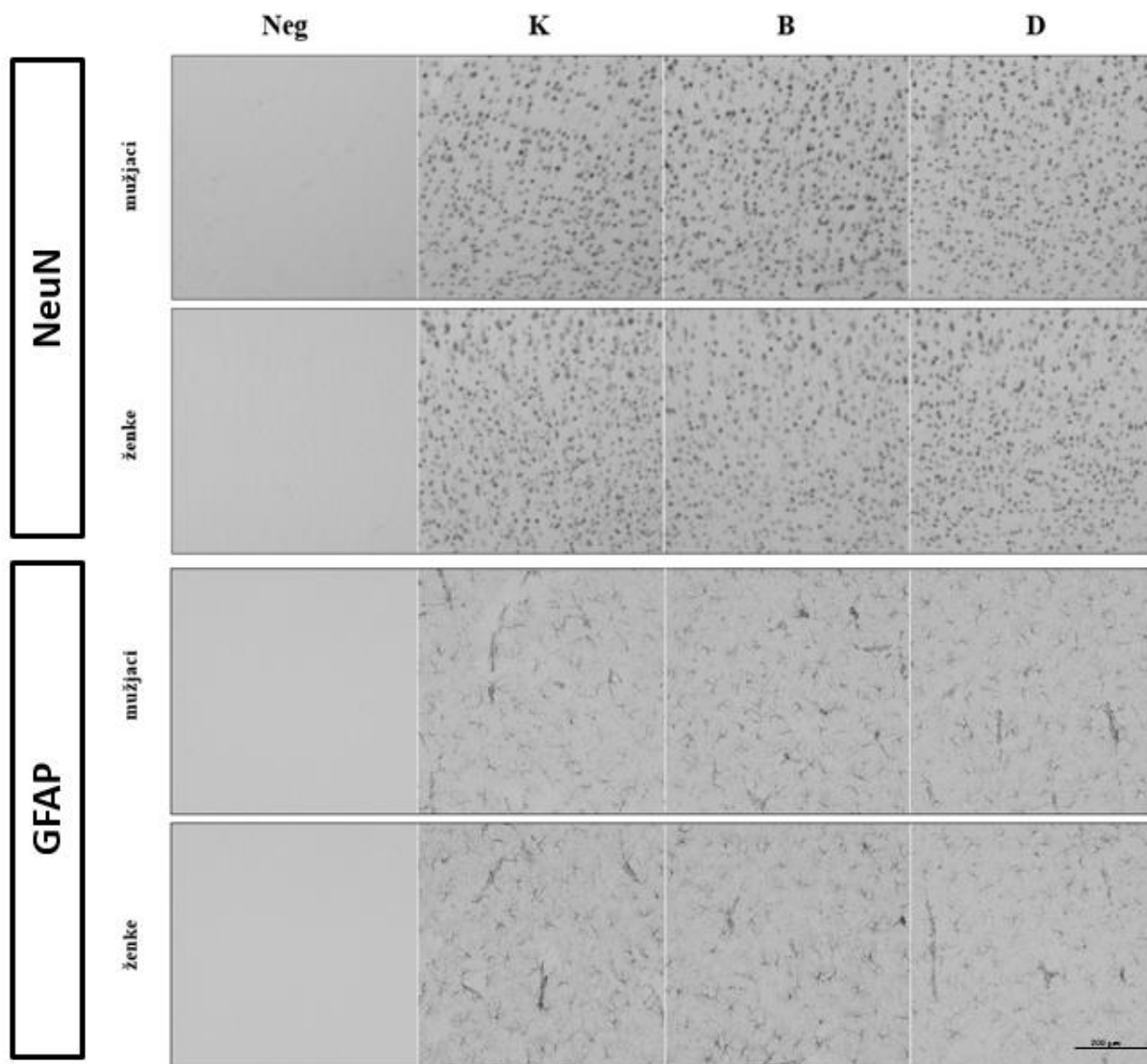
Slika 10. Imunohistokemijski prikazi slušne kore mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelima na neuronski jezgrin protein (NeuN) i glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP). Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



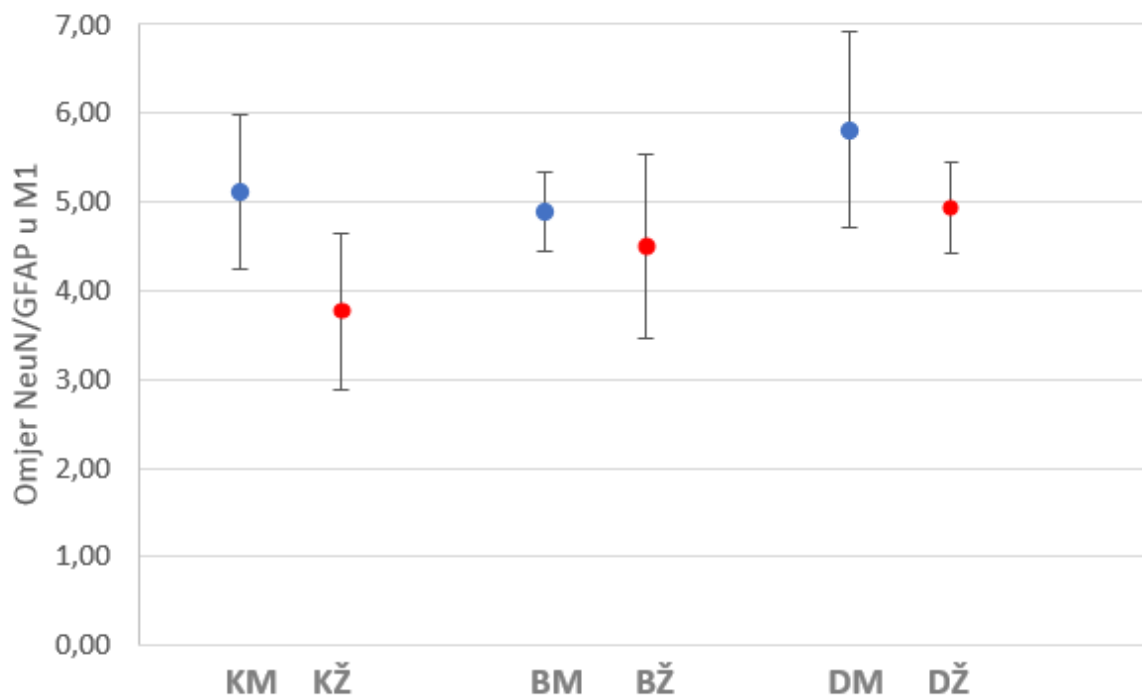
Slika 11. Omjer NeuN- i GFAP-imunopozitivnih stanica u slušnoj (Au1) moždanoj kori mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Usporedba omjera neurona i glije u motoričkoj kori mozga

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na NeuN i GFAP (Slika 12) provedena je analiza dvosmjernim ANOVA testom. Usporedbom omjera NeuN i GFAP u M1 području moždane kore Sprague Dawley štakora eksperimentalnih skupina s kontrolnom skupinom, test je pokazao kako učinci spola, tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni (Slika 13).



Slika 12. Imunohistokemijski prikazi motoričke kore mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelima na neuronski jezgrin protein (NeuN) i glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP). Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



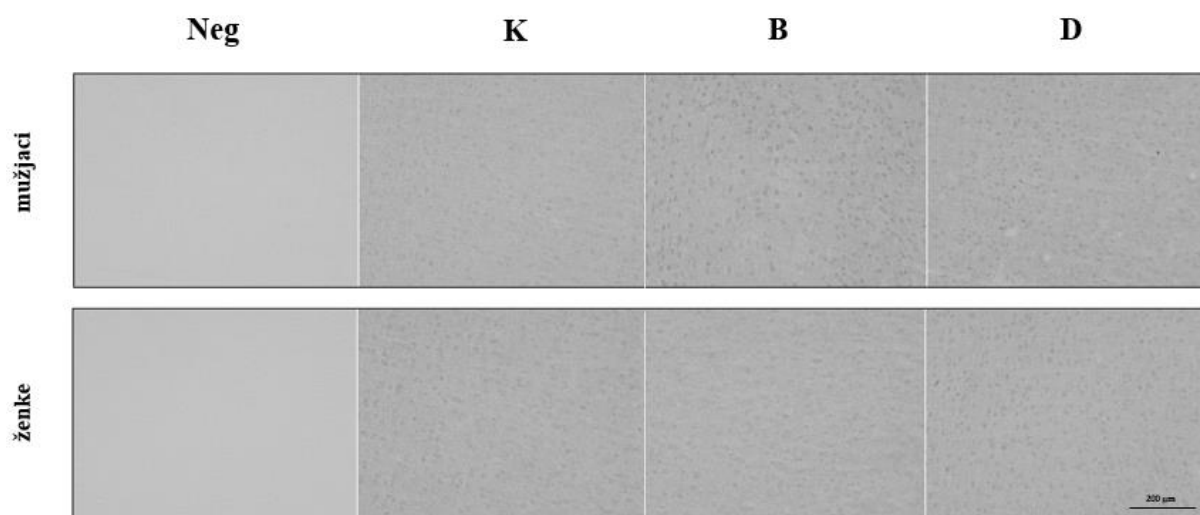
Slika 13. Omjer NeuN- i GFAP-imunopozitivnih stanica u motoričkoj moždanoj kori mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

#### 5.4. Analiza izražaja histaminskog receptora 1

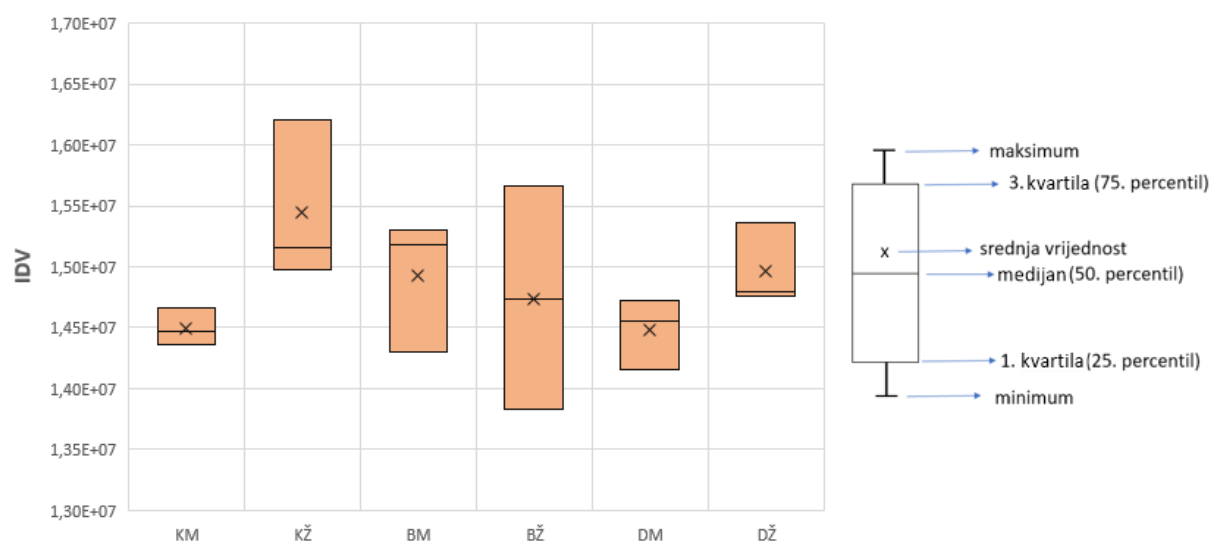
##### Izražaj histaminskog receptora 1 u primarnoj slušnoj kori mozga

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na H1R (Slika 14) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u Au1 području moždane kore Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala kako učinci spola, tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni (Slika 15).





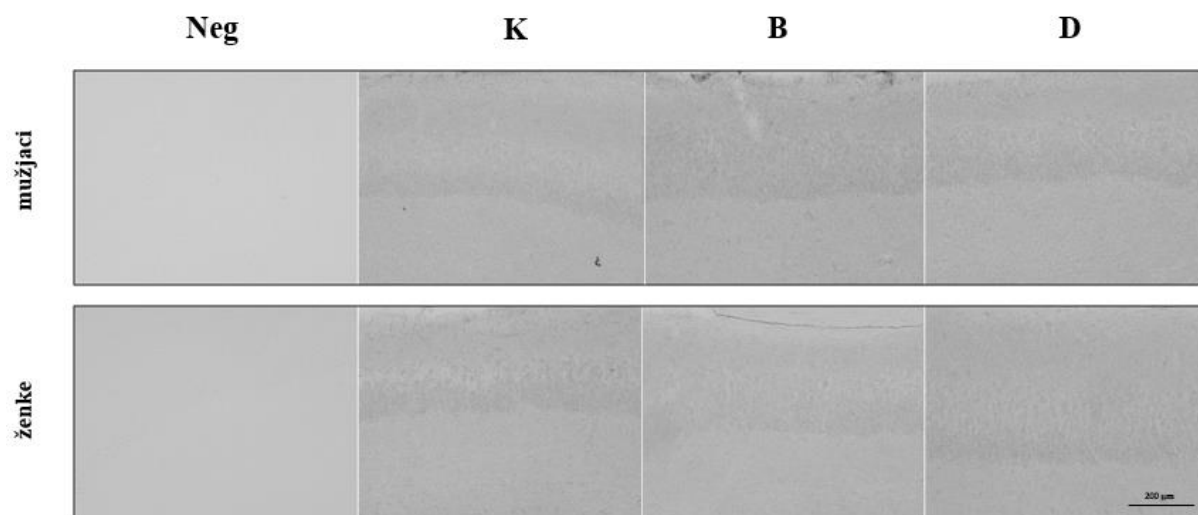
Slika 14. Imunohistokemijski prikazi slušne kore mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na histaminski receptor 1. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



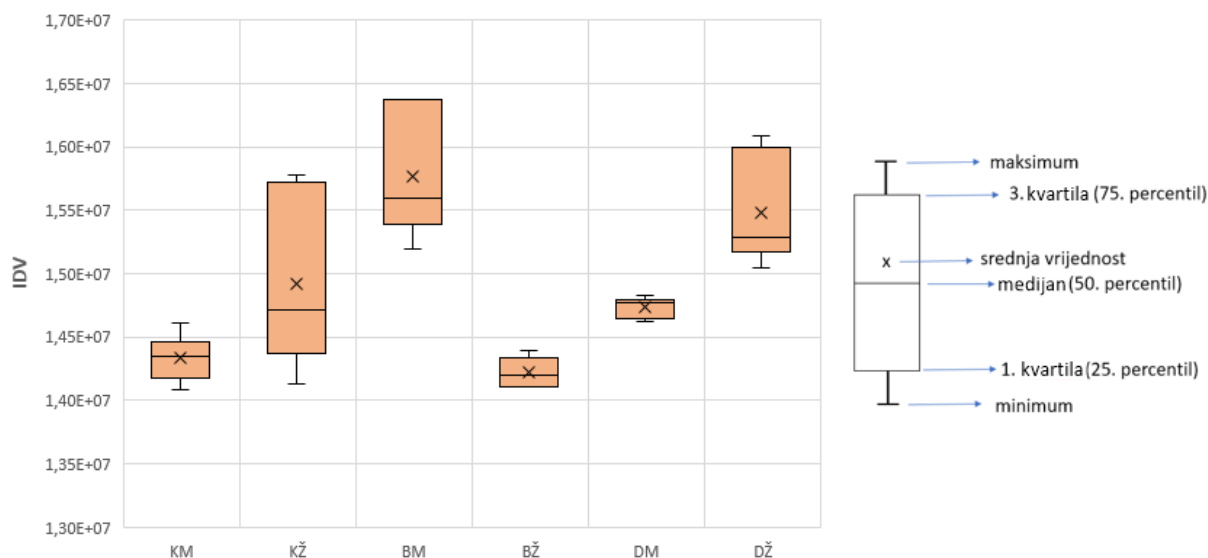
Slika 15. Izražaj histaminskog receptora 1 u slušnoj kori mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mušjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj histaminskog receptora 1 u CA3 području hipokampusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na H1R (Slika 16) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u CA3 području hipokampusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza izražaja pokazala je da tretman sam po sebi uzrokuje statistički značajan učinak  $F_{(2,35)} = 4,853$ ,  $p = 0,015$  (Slika 17). Također, učinak interakcije spola i tretmana bio je statistički značajan  $F_{(2,35)} = 31,09$ ,  $p = 4,861 \times 10^{-8}$ , dok sam spol ne dovodi do statistički značajnih učinaka. Tretman desloratadinom doveo je do povećanja izražaja H1R u CA3 području hipokampusa u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,015$ ). *Post hoc* test otkrio je kako je skupina BM imala statistički značajno veći izražaj H1R u CA3 području u odnosu na KM ( $p = 6,78 \times 10^{-6}$ ), dok je skupina BŽ imala statistički značajno manji izražaj H1R u odnosu na KŽ ( $p = 0,037$ ). Također, skupina BM imala je statistički značajno veći izražaj H1R u odnosu na BŽ ( $p = 1,682 \times 10^{-6}$ ) te je skupina DŽ imala veći izražaj u odnosu na DM ( $p = 5,129 \times 10^{-5}$ ) (Slika 17).



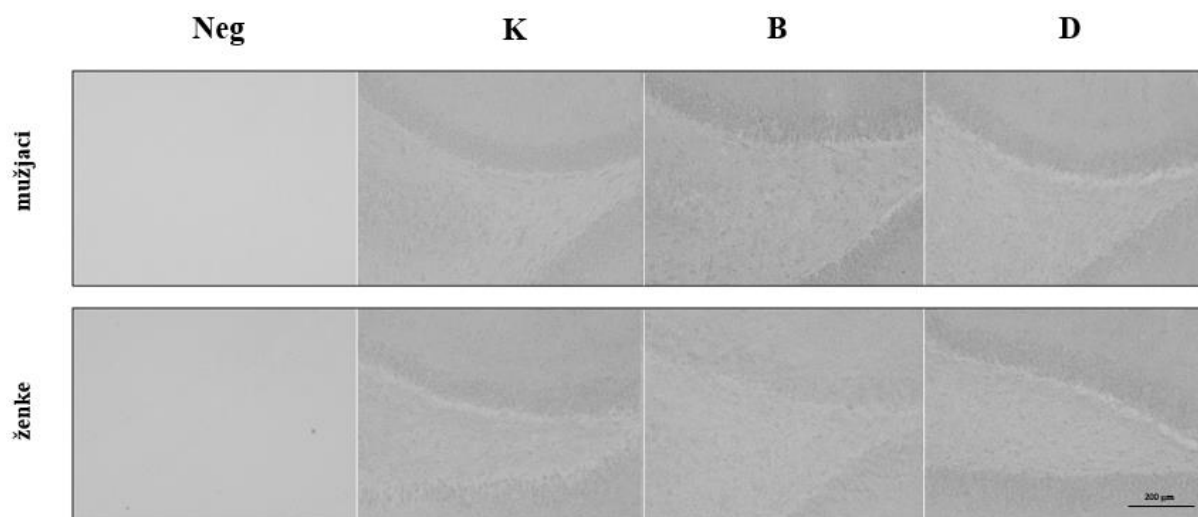
Slika 16. Imunohistokemijski prikazi CA3 područja hipokampusa mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na histaminski receptor 1. Povećanje 200 $\times$ . S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



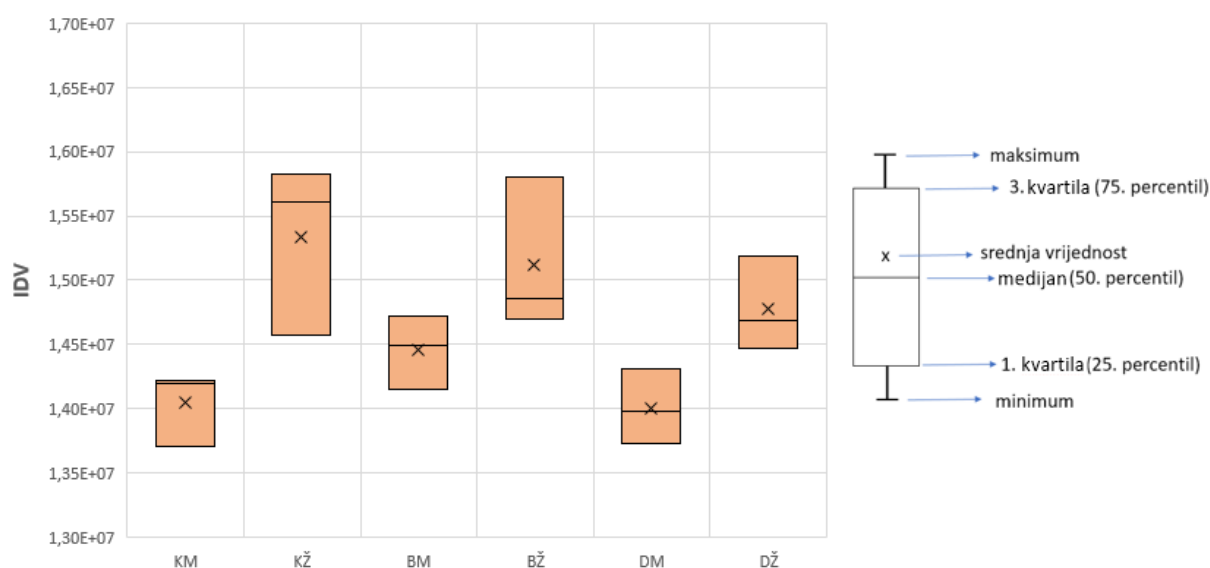
Slika 17. Izražaj histaminskog receptora 1 u CA3 području hipokampusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj histaminskog receptora 1 u području dentatnog girusa hipokampusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na H1R (Slika 18) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u području dentatnog girusa (DG) hipokampusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Test je pokazao kako je učinak interakcije tretmana i spola statistički značajan u analiziranom području  $F_{(2,17)} = 11,3$ ,  $p = 0,002$  (Slika 19). Učinci spola i tretmana nisu bili statistički značajni. Tukeyjev *post hoc* test otkriva da je skupina BM imala statistički značajno veći izražaj H1R u DG području u odnosu na KM ( $p = 0,028$ ) te kako je skupina BŽ imala statistički značajno veći izražaj u odnosu na BM ( $p = 0,023$ ).



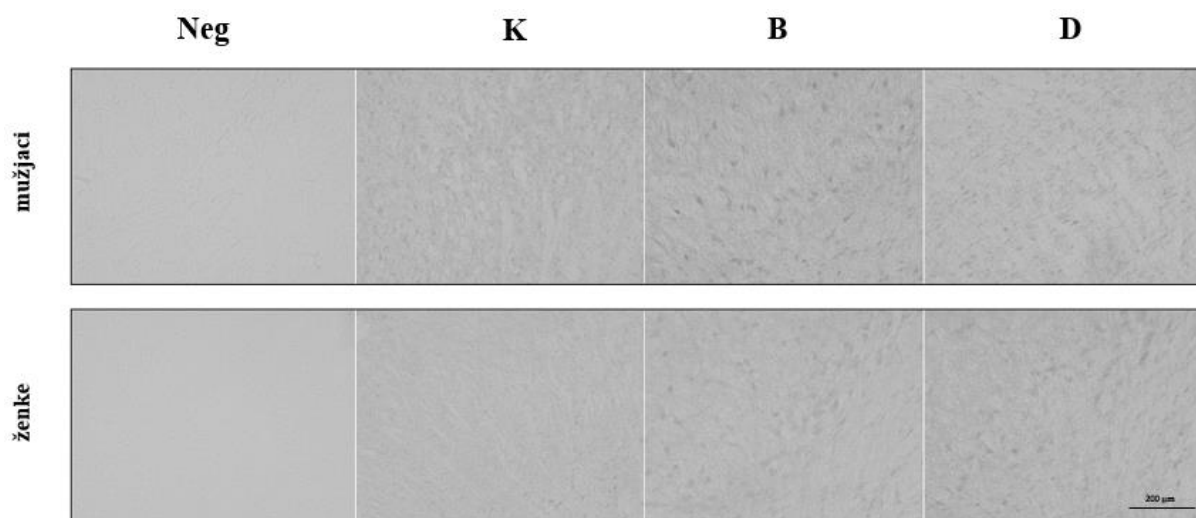
Slika 18. Imunohistokemijski prikazi DG područja hipokampusa mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na histaminski receptor 1. Povećanje 200 $\times$ . S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



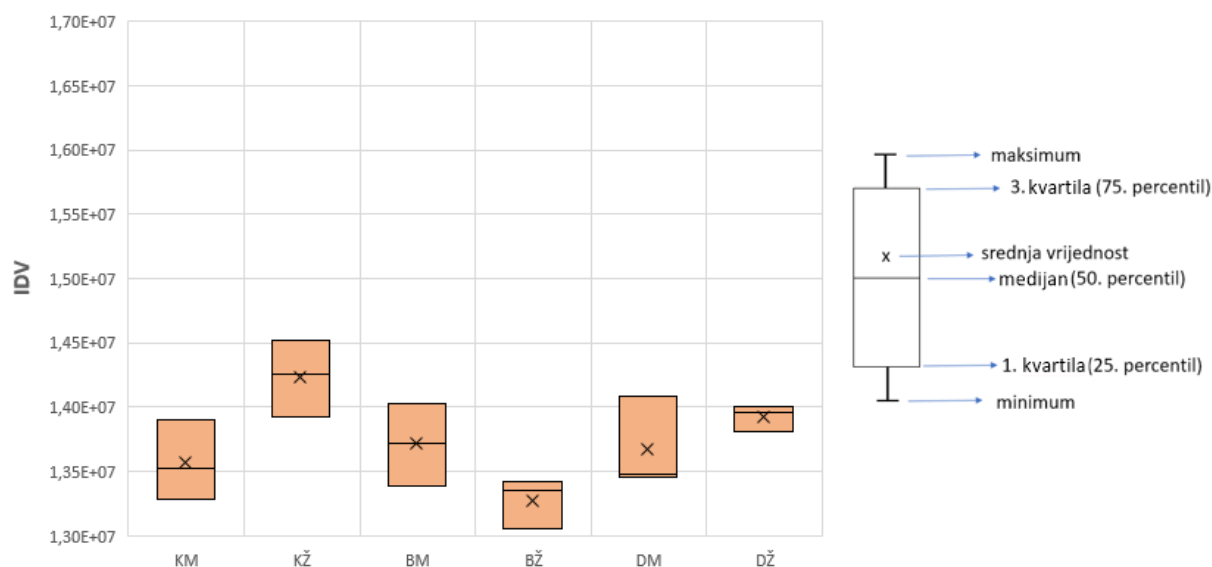
Slika 19. Izražaj histaminskog receptora 1 u DG području hipokampusa mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mušjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj histaminskog receptora 1 u jezgri *substantia nigra* srednjeg mozga

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na H1R (Slika 20) provedena je analiza izražaja receptora u jezgri *substantia nigra* (SNR) srednjeg mozga Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza izražaja pokazala je da samo tretman izaziva statistički značajan učinak  $F_{(2,17)} = 5,913$ ,  $p = 0,016$  (Slika 21). Učinci spola te interakcije spola i tretmana nisu doveli do statistički značajnog rezultata. Tretman bilastinom izazvao je povećanje izražaja H1R kod mužjaka, a smanjenje izražaja H1R kod ženki u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,016$ ).



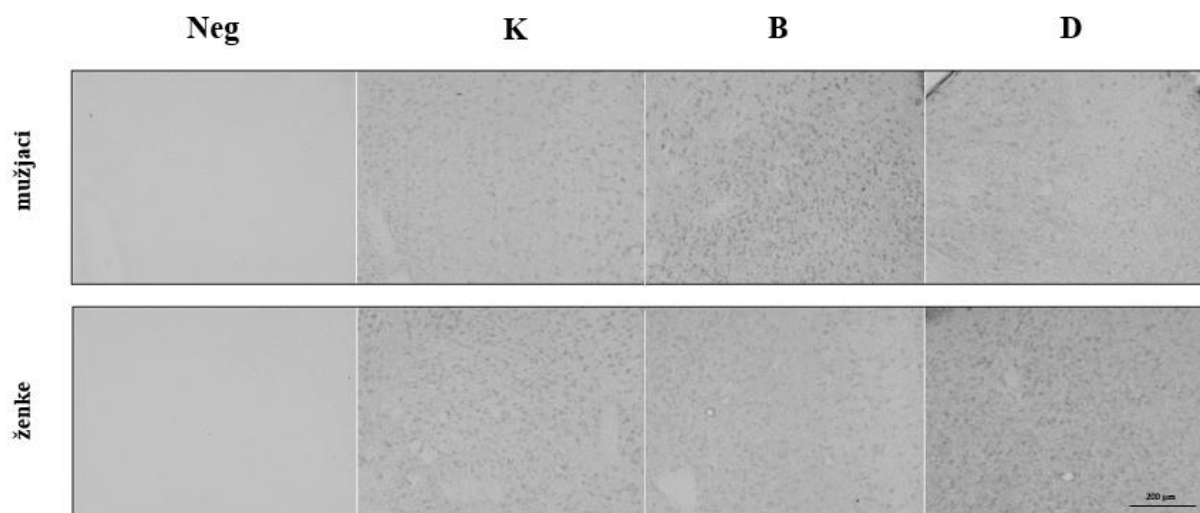
Slika 20. Imunohistokemijski prikazi jezgre *substantia nigra* srednjeg mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na histaminski receptor 1. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



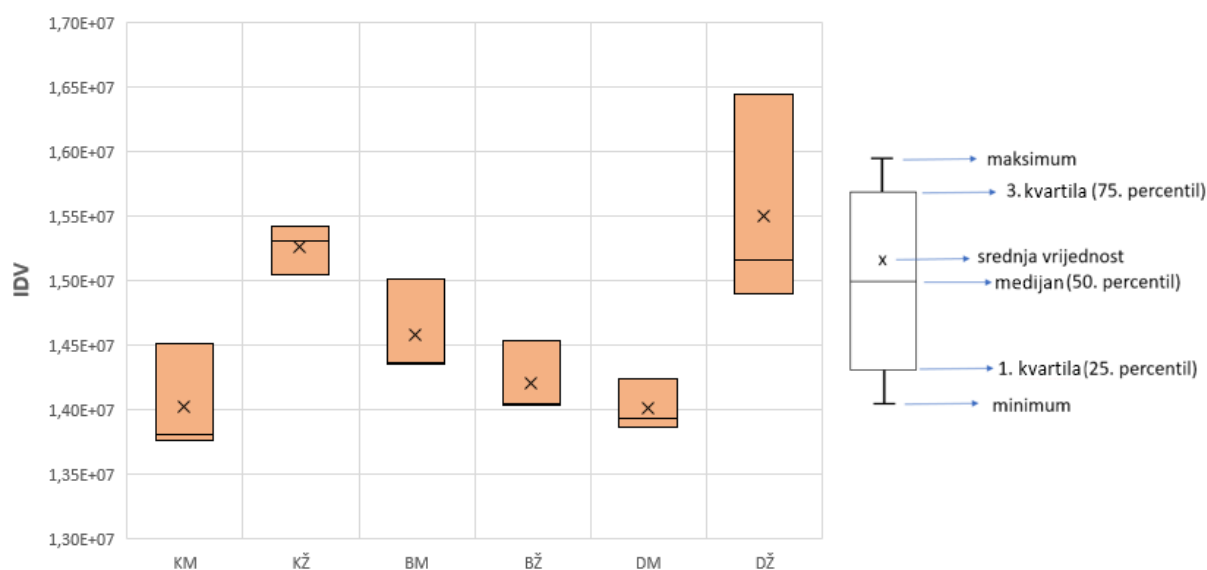
Slika 21. Izražaj histaminskog receptora 1 u jezgri *substantia nigra* srednjeg mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj histaminskog receptora 1 u tuberomamilarnoj jezgri hipotalamusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na H1R (Slika 22) provedena je analiza izražaja receptora u tuberomamilarnoj (TMN) jezgri hipotalamusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala statistički značajan rezultat u slučaju učinaka tretmana  $F_{(2,17)} = 6,663$ ,  $p = 0,011$  te interakcije spola i intrauterinog tretmana  $F_{(2,17)} = 9,459$ ,  $p = 0,003$  (Slika 23). Učinak spola sam po sebi nije bio statistički značajan. *Post hoc* test učinaka tretmana otkriva da je tretman desloratadinom izazvao promjenu izražaja H1R u TMN području ( $p = 0,009$ ). Također, *post hoc* analiza otkrila je da statistički značajno veći izražaj H1R ima skupina BM u odnosu na KM ( $p = 0,033$ ) te kako ujedno i skupina DŽ ima statistički značajno veći izražaj u odnosu na KŽ ( $p = 0,024$ ).



Slika 22. Imunohistokemijski prikazi tuberomamilarne jezgre hipotalamusa mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na histaminski receptor 1. Povećanje 200 $\times$ . S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.

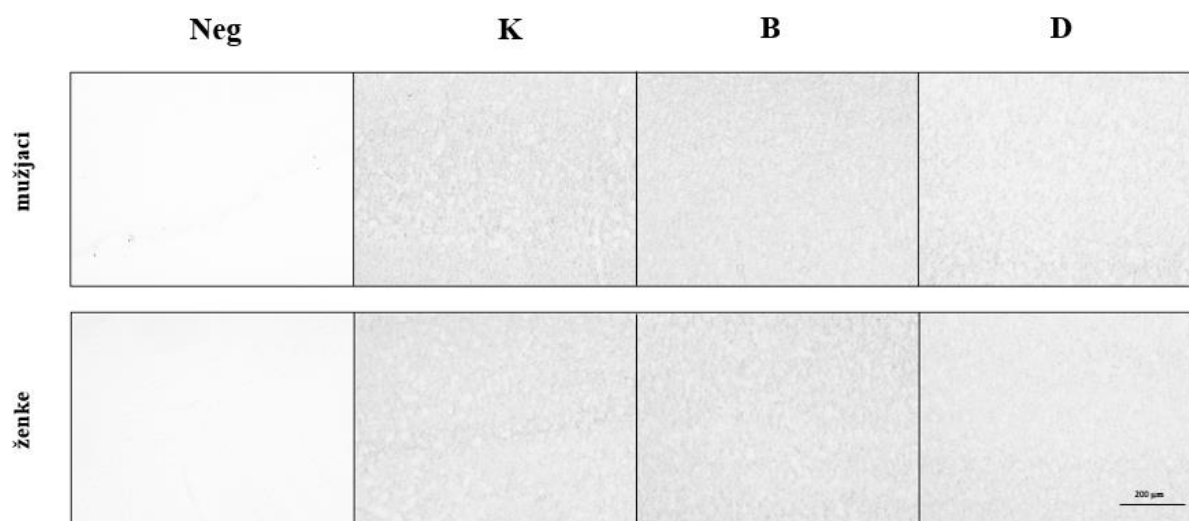


Slika 23. Izražaj histaminskog receptora 1 u tuberomamilarnoj jezgri hipotalamusa mušjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mušjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mušjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

## 5.5. Analiza izražaja neuroplastina 65

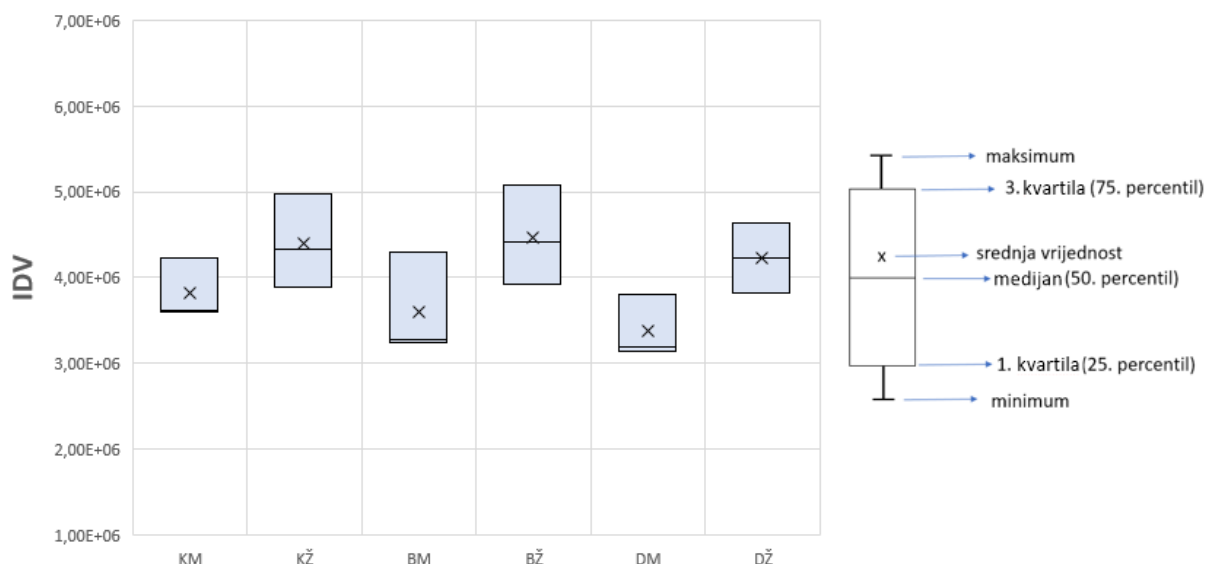
### Izražaj neuroplastina 65 u primarnoj slušnoj kori mozga

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na Np65 (Slika 24) provedena je analiza izražaja receptora u Au1 području moždane kore Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analizom izražaja otkriveno je kako je statistički značajan samo učinak spola  $F_{(1,17)} = 11,07$ ,  $p = 0,006$  (Slika 25). Ženke pokazuju veći izražaj Np65 u odnosu na mužjake. Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.



Slika 24. Imunohistokemijski prikazi slušne kore mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na neuroplastin 65. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.

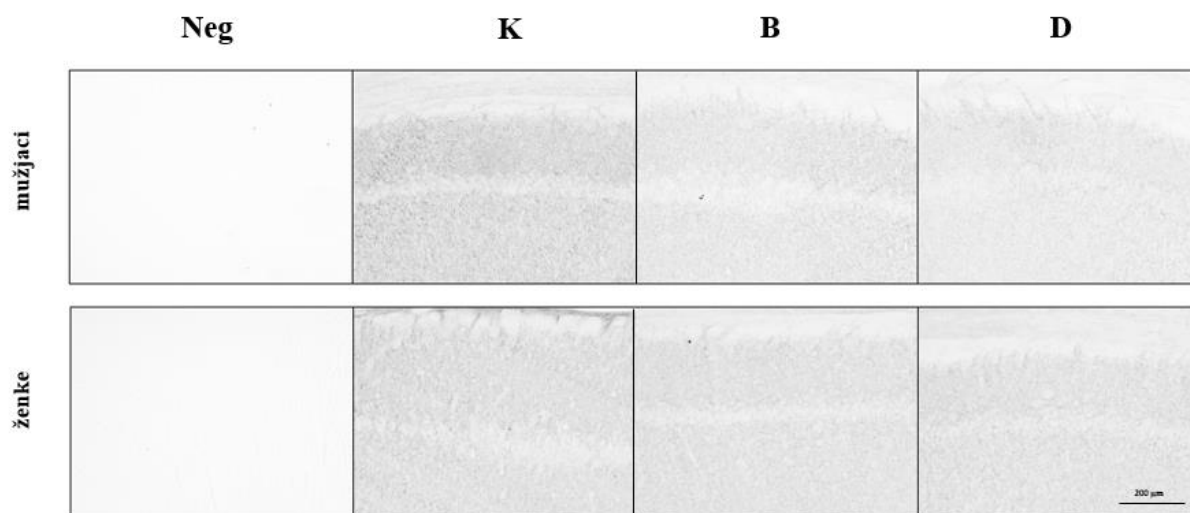




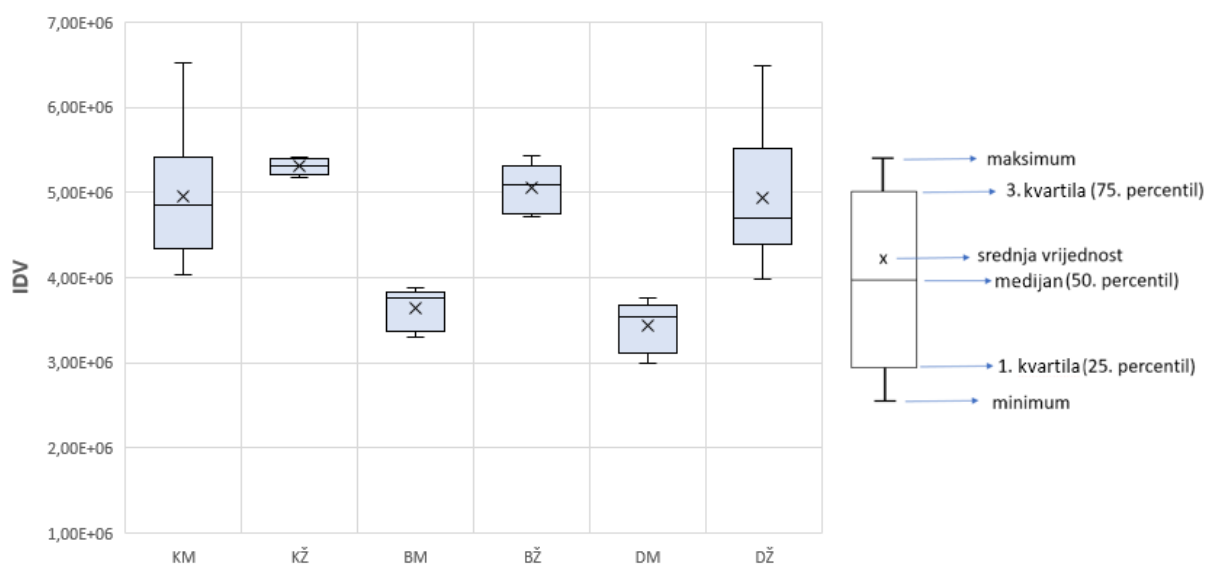
Slika 25. Izražaj neuroplastina 65 u slušnoj kori mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj neuroplastina 65 u CA3 području hipokampusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na Np65 (Slika 26) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u CA3 području hipokampusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom koja je otkrila statistički značajan rezultat. Statistički su značajni učinci tretmana  $F_{(2,35)} = 10,87$ ,  $p = 2,8 \times 10^{-4}$ , spola  $F_{(1,35)} = 37,62$ ,  $p = 9,6 \times 10^{-7}$  te njihove interakcije  $F_{(2,35)} = 4,318$ ,  $p = 0,023$  (Slika 27). Kod skupina tretiranih bilastinom i desloratadinom ima značajno manje Np65 u odnosu na kontrolne skupine. Također, Tukeyjev *post hoc* test otkriva da su statistički značajno manji izražaj Np65 u CA3 području imale skupine BM ( $p = 0,0016$ ) i DM ( $p = 2,4 \times 10^{-4}$ ) u odnosu na KM. Kod ženki nije bilo tako drastičnih promjena.



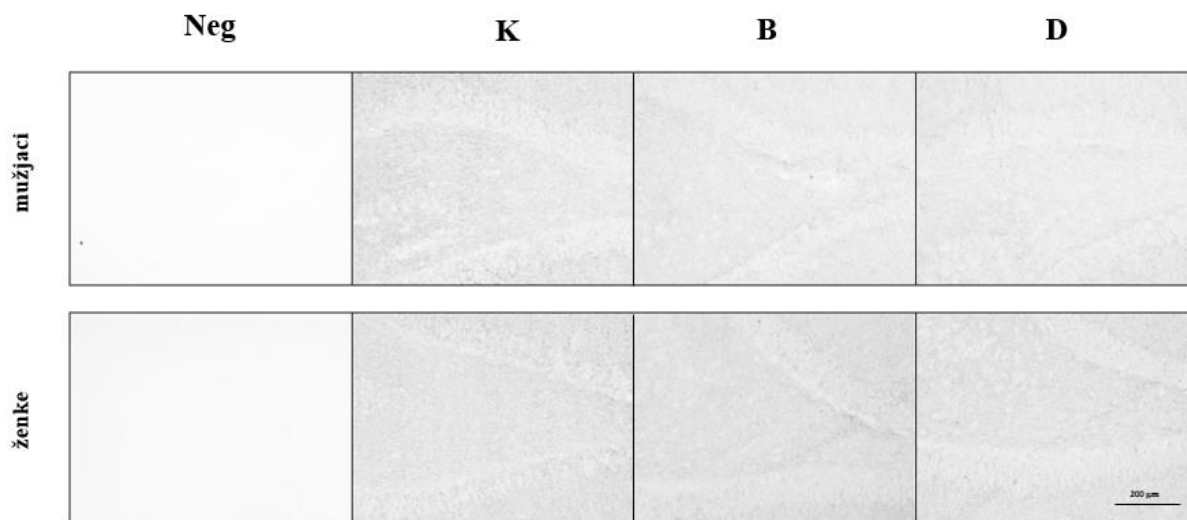
Slika 26. Imunohistokemijski prikazi CA3 područja hipokampusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na neuroplastin 65. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



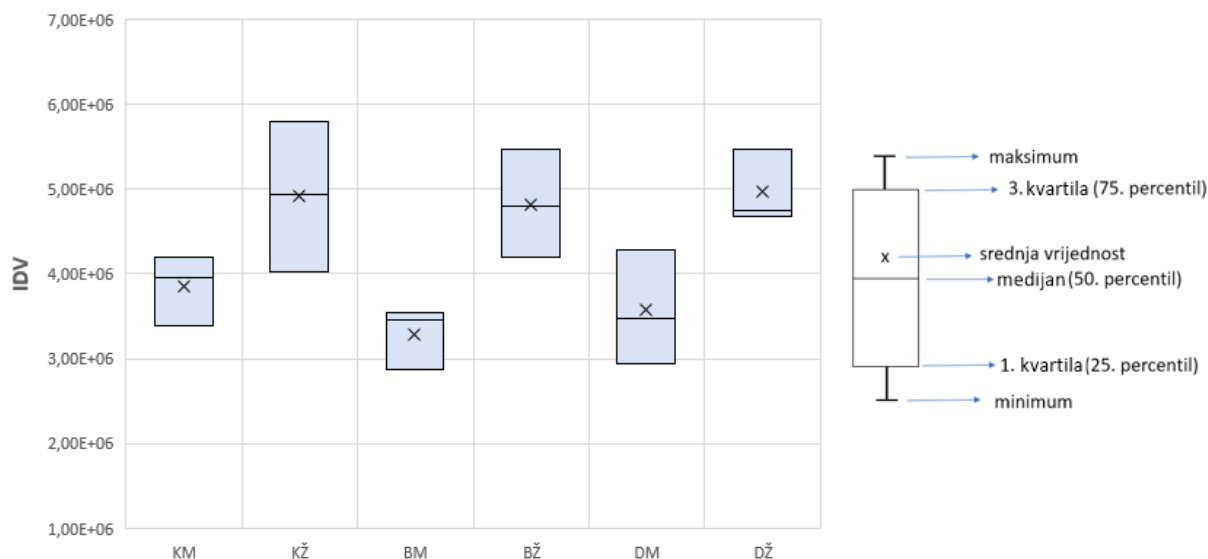
Slika 27. Izražaj neuroplastina 65 u CA3 području hipokampusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj neuroplastina 65 u području dentatnog girusa hipokampusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na Np65 (Slika 28) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u području dentatnog girusa hipokampusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala da je statistički značajan samo učinak spola  $F_{(1,17)} = 22,22$ ,  $p = 0,0005$  (Slika 29). Ženke pokazuju veći izražaj Np65 u odnosu na mužjake. Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.



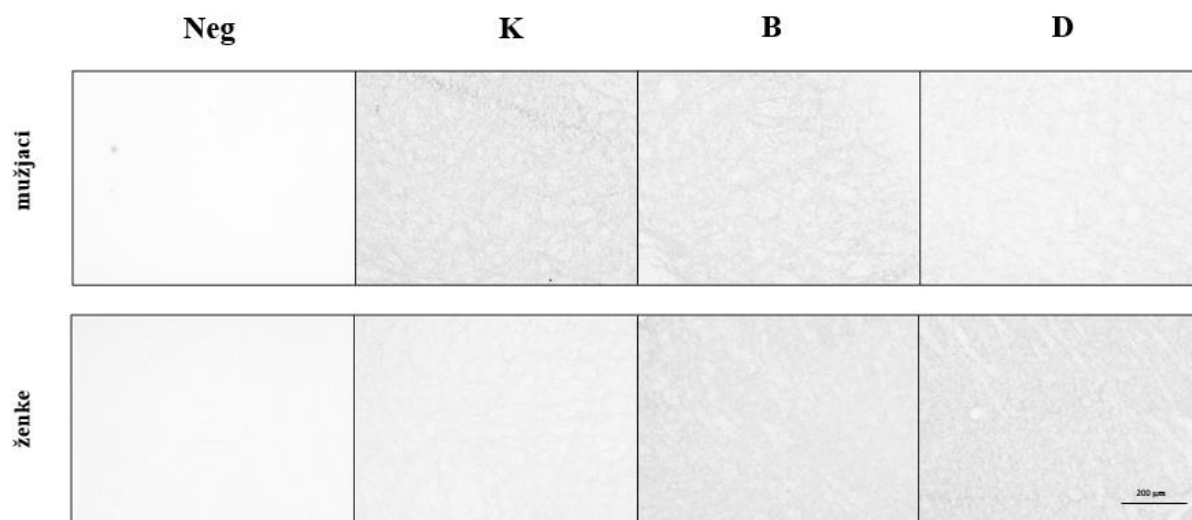
Slika 28. Imunohistokemijski prikazi područja dentatnog girusa hipokampusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na Np65. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



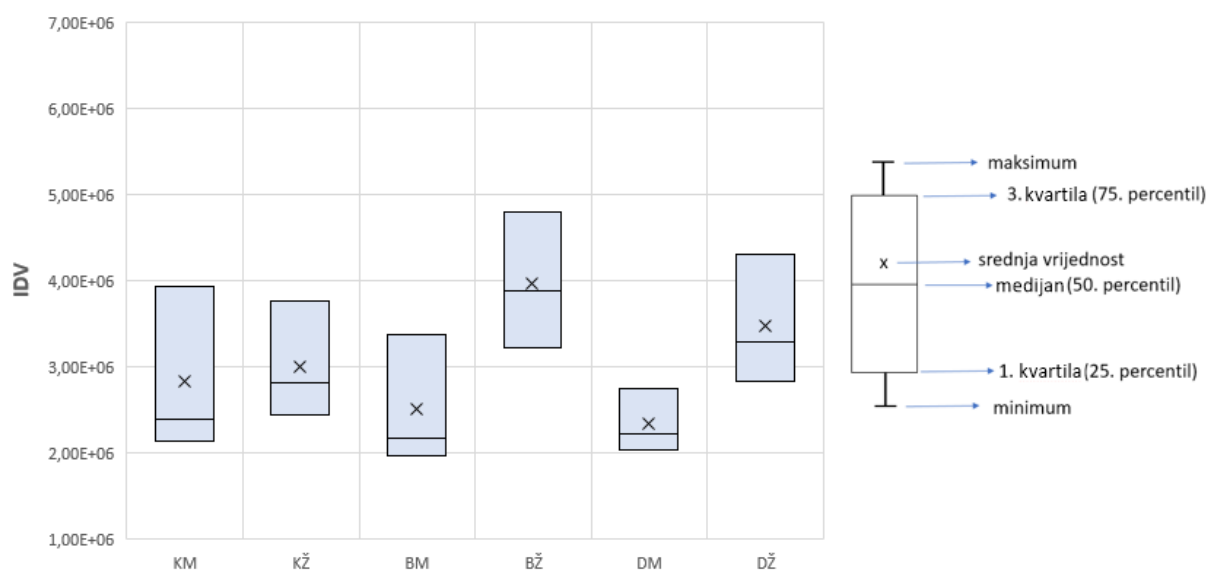
Slika 29. Izražaj neuroplastina 65 u području dentatnog girusa hipokampusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj neuroplastina 65 u jezgri *substantia nigra* srednjeg mozga

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na Np65 (Slika 30) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u SNR području srednjeg mozga Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala da je statistički značajan učinak spola u ovom području  $F_{(1,17)} = 7,044$ ,  $p = 0,021$  (Slika 31). Ženke pokazuju veći izražaj Np65 u odnosu na mužjake. Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.



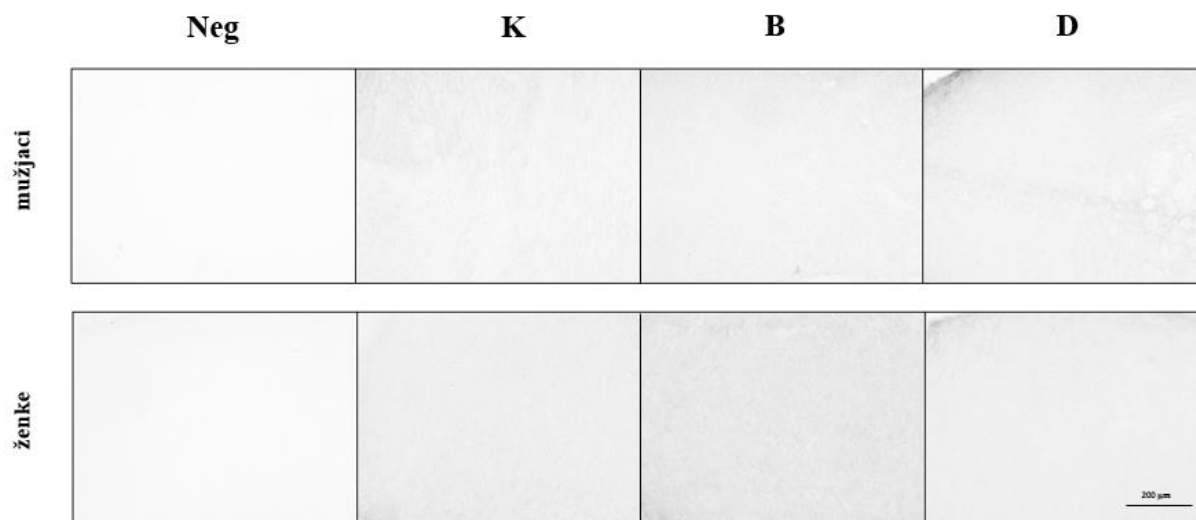
Slika 30. Imunohistokemijski prikazi jezgre *substantia nigra* srednjeg mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na neuroplastin 65. Povećanje 200 $\times$ . S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



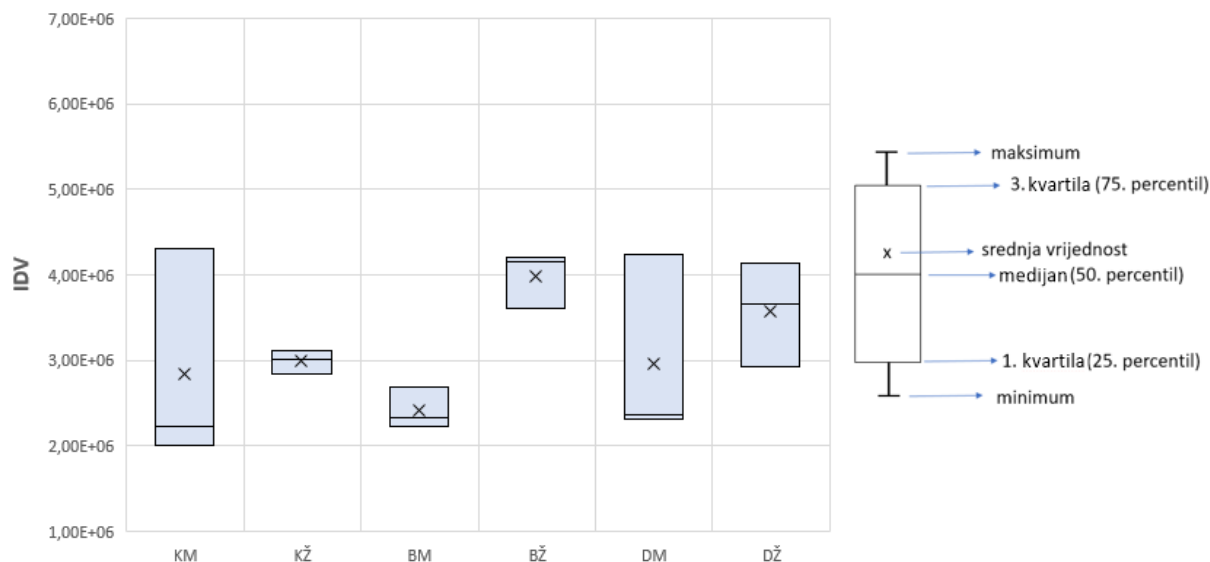
Slika 31. Izražaj neuroplastina 65 u jezgri *substantia nigra* srednjeg mozga mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

### Izražaj neuroplastina 65 u tuberomamilarnoj jezgri hipotalamusa

Na temelju kvantifikacije imunopozitivnih stanica na Np65 (Slika 32) provedena je analiza izražaja navedenog receptora u TMN jezgri hipotalamusa Sprague Dawley štakora dvosmjernim ANOVA testom. Analiza je pokazala da je statistički značajan učinak spola  $F_{(1,17)} = 4,803$ ,  $p = 0,049$  (Slika 33). Ženke pokazuju veći izražaj Np65 u odnosu na mužjake. Učinci tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni.



Slika 32. Imunohistokemijski prikazi tuberomamilarne jezgre hipotalamusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora testiranih protutijelom na neuroplastin 65. Povećanje 200×. S lijeva na desno: Neg – negativna kontrola, K – kontrolna skupina, B – skupina tretirana antihistaminikom bilastinom, D – skupina tretirana antihistaminikom desloratadinom.



Slika 33. Izražaj neuroplastina 65 u tuberomamilarnoj jezgri hipotalamusa mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora. Podaci su statistički analizirani dvosmjernim ANOVA testom uz Tukeyjev *post hoc*. BM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom bilastinom, BŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom bilastinom, DM – mužjaci intrauterino tretirani antihistaminikom desloratadinom, DŽ – ženke intrauterino tretirane antihistaminikom desloratadinom, IDV – vrijednost integrirane gustoće (engl. *integrated density value*), KM – kontrolna skupina mužjaka, KŽ – kontrolna skupina ženki.

## 6. RASPRAVA

Histamin je kemijski glasnik imunološkog sustava, ali i važan neurotransmitter središnjeg živčanog sustava kralježnjaka (1). Premda su antihistaminici lijekovi koji se koriste za liječenje alergijskih poremećaja, imaju ulogu u gastrointestinalnim i neurološkim poremećajima (10). Prvu generacija antihistaminika čine kompetitivni inhibitori histamina koji djeluju na H1 receptorsko mjesto na ciljnim stanicama u sluznici respiratornog sustava. Vrlo su lipofilni pa prolaze BBB gdje blokiraju H1 receptorska mjesta u mozgu te izazivaju sedacijski učinak (11). Druga generacija antihistaminika razvijena je kako bi se smanjila ili potpuno eliminirala sedacija i štetni antikolinergički učinci koji se javljaju kod starijih antagonista H1 receptora. Lijekovi iz ove generacije relativno su lipofobni i imaju mali volumen distribucije te slabije prolaze kroz BBB (13). Svaki lijek upotrijebljen u trudnoći nosi rizik od teratogenosti i prije toga treba pažljivo procijeniti rizik / korist od propisivanja (16). H1 antihistaminici koriste se za liječenje mučnina i povraćanja tijekom trudnoće koje se javljaju u otprilike 85 % trudnoća, i to najčešće u prvom tromjesečju (18). Ako je lijek korišten u prvom tromjesečju, može uzrokovati strukturalne fetalne malformacije i u kasnijem dijelu trudnoće mogu uslijediti razni funkcionalni defekti. Stoga se u trudnoći nastoje izbjeći konzumacije bilo kakvih lijekova te liječnici važu prednosti u odnosu na potencijalne teratogene učinke prije korištenja bilo kojeg lijeka u trudnoći (16).

Na temelju histološkog bojenja po Nisslu izradili smo prikaze anatomije mozga proučavanih skupina štakora. Skupine tretirane antihistaminicima bilastinom i desloratadinom pokazale su promjene u anatomiji hipokampusa na način da njihov hipokampus pokazuje „nabrani“ izgled, odnosno ima vijugav oblik. Uspoređujući tretirane skupine s kontrolnim skupinama, možemo vidjeti da takav izgled nije uobičajen u hipokampusu kontrolnih skupina mužjaka i ženki. Možemo pretpostaviti da je tretman antihistaminicima uzrokovao navedene promjene, no ova pretpostavka iziskuje dodatnu potvrdu.

Na temelju imunohistokemijskog bojenja NeuN-a i histološkog bojenja po Nisslu analizirana je debljina i određen udio slojeva moždane kore primarnog slušnog i motoričkog područja. U slušnom području nije bilo statistički značajne razlike u udjelima slojeva 1 i 4. No, u usporedbi s kontrolnom skupinom, ženke su pokazale veći udio slojeva 2 i 3 u odnosu na mužjake što nam govori kako je u ovom sloju učinak spola imao statistički značajan utjecaj. Učinak spola također je statistički značajno utjecao na udio slojeva 5 i 6 tako da su skupine mužjaka imale veći udio u odnosu na skupine ženki. Svaki podražaj koji dolazi iz talamusa



ulazi prvo u sloj 4, zatim projekcije idu prema slojevima 2 i 3 gdje se prispjele informacije dodatno obrađuju. Iz slojeva 2 i 3 projekcije idu prema suprotnoj hemisferi ili u susjedne regije moždane kore, ali dio projekcija ide prema slojevima 5 i 6, a odavde prema subkortikalnim ciljevima (48, 49). Razlika u debljini slojeva kod mušjaka i ženki mogla bi biti podloga razlici u obrađivanju slušnih i motoričkih podražaja koje bi se mogle utvrditi bihevioralnim testovima. Ranije su opisane spolne razlike u izgledu mozga pa su tako Qiu i suradnici u istraživanju na miševima pokazali da se mozak mušjaka u ranoj dobi razvija brže u odnosu na mozak ženki što je povezano s razlikom u razinama hormona. Za razvoj muškog mozga ključna je rana izloženost visokim koncentracijama testosterona koji se na BBB pretvara u estradiol, a koji je ključan u seksualnoj diferencijaciji mozga. Istovremeno se mozak ženki razvija bez utjecaja estrogena u ranoj fetalnoj dobi jer je ovaj blokiran alfa-fetoproteinom pa će do konačne diferencijacije pod utjecajem estrogena doći tijekom adolescencije (50). Rabinowicz i suradnici u istraživanju na ljudskom mozgu pokazali su razlike u strukturi moždane kore između muškaraca i žena. Moždana kora muškaraca ima veću neuronsku gustoću s manje neuropila po neuronu i kao takva može poboljšati fokus i specifičnost funkcija moždane kore. Suprotno tome, veći opseg neuropila ženskog mozga po neuronu može poboljšati integraciju informacija iz različitih izvora (51). Dakle, naši rezultati prikaz su normalnog stanja moždane kore u promatranoj dobi.

Analizom slojeva u M1 području moždane kore dvosmjerni ANOVA test otkrio je da na udio slojeva 1, 2 i 3 tretman nema statistički značajnih učinaka. Statistički značajan utjecaj na udio sloja 4 pokazala je interakcija intrauterinog tretmana i spola i to na način da su mušjaci iz skupine B imali statistički značajno manji udio sloja 4 u odnosu na kontrolnu skupinu te skupinu B ženki. Ovaj rezultat govori nam kako mušjaci tretirani antihistaminikom bilastinom, za razliku od ženki, nisu na isti način obrađivali informacije koje stižu iz talamusa u sloj 4. Učinak tretmana pokazao je statistički značajnu razliku na udio slojeva 5 i 6. Skupine mušjaka i ženki tretirane antihistaminikom bilastinom imale su značajno manji udio spomenutih slojeva u odnosu na kontrolnu skupinu što upućuje na mogućnost razlike u snazi subkortikalnih projekcija promatranih skupina. Kako je primarno motorno područje ključna struktura za aktivnost voljnih pokreta i za učenje motornih vještina potrebno je pobliže istražiti ove promjene bihevioralnim testovima (52). Naime, još nije provedeno istraživanje ovog tipa pa nema podataka s kojima bismo mogli usporediti naše rezultate, stoga bi u budućnosti trebalo provesti detaljnije istraživanje utjecaja bilastina na primarna osjetna područja moždane kore.

Imunohistokemijskim bojenjem glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) vizualizirali smo astrogliju, a tijela neurona već spomenutim bojenjem NeuN te smo izračunali i usporedili omjer neurona i astroglije u Au1 i M1 područjima moždane kore eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu. Analiza dvosmjernim ANOVA testom pokazala je kako antihistaminici povećavaju omjer NeuN/GFAP u Au1 području što znači da se povećava udio neurona, a smanjuje udio glije, što je vidljivo na imunohistokemijskim prikazima preparata i pratećim kvantifikacijama (slike 10 i 11). Ovaj rezultat ne znači nužno kako se broj GFAP pozitivnih stanica u mozgu štakora smanjio, već može biti odraz povećanja broja neurona u odnosu na gliju čiji je izražaj ostao isti i nakon intrauterine primjene antihistaminika. Nadalje, rezultat je neobičan s obzirom da bilastin i desloratadin pripadaju antihistaminicima druge generacije i klasificirani su kao antihistaminici koji ne prelaze BBB (53). Usporedbom omjera u M1 području moždane kore test je pokazao kako nema statistički značajnih rezultata.

Analiza izražaja H1R pokazala je kako učinci spola, tretmana te interakcije spola i tretmana nisu bili statistički značajni u Au1 području moždane kore. No, pokazalo se kako je tretman desloratadinom povećao izražaj H1R u CA3 području hipokampusa u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, međusobno se statistički značajno razlikuju skupine tretirane bilastinom od kontrolne te postoji statistički značajna razlika unutar skupina B i D kao i uspoređujući ih međusobno. U DG području učinak interakcije tretmana i spola bio je statistički značajan uzrokujući povećanje izražaja H1R u skupini mužjaka tretiranoj antihistaminikom bilastinom. Također, statistički se međusobno razlikuju skupine mužjaka tretiranih bilastinom od skupina ženki tretiranih bilastinom. Nadalje, dvosmjerni ANOVA test pokazao je statistički značajnu razliku u SNR području moždane kore između skupina tretiranih antihistaminikom bilastinom u odnosu na kontrolne skupine. U TMN jezgri pokazalo se da tretman desloratadinom izaziva povećanje izražaja H1R kod ženki u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički se značajno razlikuju i skupina mužjaka tretiranih antihistaminikom bilastinom u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka. Dobiveni rezultati nisu u skladu sa dosadašnjim istraživanjima. Primjerice, Nakamura i suradnici u svom istraživanju pokazali su kako se desloratadin ne veže značajno na H1R u mozgu (29). Također, Sanchez-Borges i Ansotegui pokazali su da bilastin uzrokuje neznačajnu H1R zauzetost u mozgu te kako nema utjecaja na središnji živčani sustav (54). Korisno bi bilo provesti novo istraživanje koje će se temeljiti na detaljnijem proučavanju utjecaja antihistaminika bilastina i desloratadina na izražaj H1R u područjima moždane kore koja su istraživana u ovom radu.

Imunohistokemijskim bojenjem na Np65 analizirali smo izražaj navedenog receptora te zaključili kako je statistički značajan rezultat pokazao samo učinak spola u područjima Au1, DG, SNR i TMN. Ženke su pokazale veći izražaj Np65 u odnosu na mužjake. Dvosmjerni ANOVA test utvrdio je da su statistički značajni učinci tretmana, spola te interakcije spola i tretmana u CA3 području moždane kore. Međusobno se statistički razlikuju kontrolna skupina mužjaka i skupina mužjaka tretirana bilastinom, kao i skupina mužjaka tretiranih desloratadinom u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod skupina mužjaka tretiranih antihistaminicima ima značajno manje Np65 u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako je Np65 bitan transmembranski glikoprotein jer regulira nastanak, održavanje i plastičnost sinapsi, kao i kognitivne funkcije poput pamćenja i osjećaja, svako smanjenje njegova izražaja može imati negativne posljedice (41-43). Tako su Li i suradnici proveli istraživanje na miševima s isključenim genom za Np65 i došli do spoznaje da nedostatak Np65 uzrokuje emocionalne i kognitivne poremećaje (55). Hu i suradnici su pak pokazali da isti miševi imaju veću vjerojatnost ishemije u mozgu (56). Skupine ženki tretiranih antihistaminicima nisu pokazale tako drastične promjene u CA3 području.

Uzimajući u obzir rezultate ovog istraživanja može se zaključiti kako antihistaminici bilastin i desloratadin djeluju na razvoj neurona i glije, kao i na izražaj H1R te sinaptogenezu. No, kako je ovo istraživanje prvo koje istražuje utjecaj navedenih antihistaminika kod potomaka tretiranih štakorica na proučavana područja u mozgu, nema prikladne literature s kojom bismo usporedili dobivene rezultate. Budući da se rezultati kose sa spoznajom kako antihistaminici druge generacije ne prelaze BBB i time ne uzrokuju promjene u mozgu, treba provesti dodatna istraživanja te odrediti točan mehanizam djelovanja istih na ispitivana područja. Korisno bi bilo u naredna istraživanja uključiti veći broj Sprague Dawley štakorica koje će biti tretirane bilastinom i desloratadinom jer bi time dobili veći uzorak i objektivnije rezultate što je od velike važnosti za sve trudnice koje će koristiti jedan od navedenih antihistaminika. Treba pažljivo proučiti i procijeniti rizike kako ne bi došlo do negativnih i nepovratnih posljedica.

## **7. ZAKLJUČAK**

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

1. Skupine životinja tretirane antihistaminicima bilastinom i desloratadinom pokazale su promjene u anatomiji hipokampusa.
2. Nije bilo statistički značajne razlike na udio slojeva moždane kore u Au1 području. Skupine tretirane antihistaminikom bilastinom pokazale su statistički značajnu razliku u udjelima slojeva 4, 5 i 6 u M1 području moždane kore.
3. Analizom omjera neurona i glije u Au1 području moždane kore utvrđeno je kako antihistaminici povećavaju omjer NeuN/GFAP. U M1 području nema statistički značajnih promjena.
4. Antihistaminici povećavaju izražaj H1R u CA3, DG, SNR i TMN područjima, no u Au1 području nema statistički značajne promjene.
5. Tretman antihistaminicima uzrokuje smanjenje izražaja Np65 u CA3 području hipokampusa, dok u područjima Au1, DG, SNR i TMN nema značajnih promjena.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Usporediti tri skupine potomaka netretiranih majki ili majki tretiranih antihistaminicima s obzirom na izražaj H1 receptora, markere neurona i glije te neuroplastin kao marker sinaptogeneze.

**Nacrt studije:** U studiju je uključeno 36 životinja starosti 3 mjeseca. Životinje su podijeljene u 3 skupine: 1. potomci netretiranih Sprague Dawley štakorica (kontrola), 2. potomci štakorica tretiranih desloratadinom, 3. potomci štakorica tretiranih bilastinom.

**Materijali i metode:** Histološkom bojom krezil violet prikazali smo jezgre stanica u mozgu te tako razaznali slojeve mozga. Imunohistokemijski, pomoću visokospecifičnih protutijela na H1 receptor, neuronski jezgrin protein, glijalni fibrilarni kiseli protein te neuroplastin 65, prikazali smo navedene epitope u tkivu mozga.

**Rezultati:** Postoji statistički značajna razlika u izražaju H1R i Np65 u pojedinim područjima mozga štakora, zatim u udjelima slojeva u M1 području te u omjeru NeuN/GFAP u Au1 području moždane kore. Također, tretirane skupine pokazuju promjene u anatomiji hipokampusa.

**Zaključak:** Antihistaminici bilastin i desloratadin djeluju na razvoj neurona i glije, izražaj H1R te sinaptogenezu u mozgu štakora.

**Ključne riječi:** antihistaminici, histamin, mozak, trudnoća

## 9. SUMMARY

Effect of desloratadine and bilastine antihistamines on brain development of Sprague Dawley rats

**Objectives:** To compare three groups of cubs originating from untreated mothers or mothers treated with antihistamines with respect to H1 receptor expression, neuronal and glial markers, and neuroplastin as a marker of synaptogenesis.

**Study design:** The study included 36 animals at the age of 3 months. Animals were divided into 3 groups: 1 offspring of untreated Sprague Dawley rats (control), 2 offspring of desloratadine-treated rats, 3 offspring of bilastine-treated rats.

**Material and methods:** With the histological stain of cresyl violet we showed the cell nuclei in the brain and thus distinguished the layers of the brain. Immunohistochemically, using highly specific antibodies to the H1 receptor, neuronal nuclear protein, glial fibrillary acidic protein and neuroplastin 65, we presented these epitopes in brain tissue.

**Results:** The results showed statistically significant differences in the expression of H1R and Np65 in individual areas of the rat brain, also in the proportions of layers in the M1 region and in the NeuN/GFAP ratio in the Au1 region of the cerebral cortex. Also, the treated groups show changes in the anatomy of the hippocampus.

**Conclusion:** The antihistamines bilastine and desloratadine act on the development of neurons and glia, H1R expression and synaptogenesis in the rat brain.

**Keywords:** antihistamines, histamine, brain, pregnancy

**10. LITERATURA**

1. Simons FE, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;128(6):1139-1150.e4.
2. Molina-Hernandez A, Diaz NF, Arias-Montano JA. Histamine in brain development. *J Neurochem*. 2012;122:872–882.
3. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*. 2008;88: 1183–1241.
4. Passani MB, Panula P, Lin J-S. Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:64.
5. Panula P, Lintunen M, Karlstedt K. Histamine in brain development and tumors. *Cancer Biol*. 2000;10:11-14.
6. Torrealba F, Riveros ME, Contreras M, Valdes JL. Histamine and motivation. *Front Syst Neurosci*. 2012;6:51.
7. Lindskog M. Histamine Receptors in the cross-talk between periphery and brain. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017;20(5):400-402.
8. Tabarean IV. Histamine receptor signaling in energy homeostasis. *Neuropharmacol*. 2016;106:13-19.
9. Monczor F, Fernandez M. Current knowledge and perspectives on histamine H1 and H2 receptor pharmacology: Functional selectivity, receptor crosstalk, and repositioning of classic histaminergic ligands. *Mol Pharmacol*. 2016;90(5):640-648.
10. Church MK. Allergy, histamine and antihistamines. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;241:321-331.
11. Kay GG. The effects of antihistamines on cognition and performance. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(6):622-627.
12. Randall KL, Hawkins CA. Antihistamines and allergy. *Aust Prescr*. 2018;41:42-45.
13. Slater JW, Zechnich AD, Haxby DG. Second-generation antihistamines - A comparative review. *Drugs*. 1999;57(1):31-47.
14. Walsh GM, Annunziato L, Frossard N, Knol K, Levander S, Nicolas JM i sur. New insights into the second generation antihistamines. *Drugs*. 2001;61(2):207-236.
15. Golightly LK, Greos LS. Second-generation antihistamines - Actions and efficacy in the management of allergic disorders. *Drugs*. 2005;65(3):341-384.
16. Kar S, Krishnan A, Preetha K, Mohankar A. A review of antihistamines used during pregnancy. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012;3(2):105–108.

17. Gilboa SM, Ailes EC, Rai RP, Anderson JA, Honein MA. Antihistamines and birth defects: A systematic review of the literature. *Expert Opin Drug Saf.* 2014;13(12):1667–1698.
18. 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.* 2017;40(2):121-132.
19. Bachert C, Kuna P, Sanquer F, Ivan P, Dimitrov V, Gorina MM i sur. Comparison of the efficacy and safety of bilastine 20 mg vs desloratadine 5 mg in seasonal allergic rhinitis patients. *Allergy.* 2009;64:158–165.
20. Novak Z, Yanez A, Kiss I, Kuna P, Tortajada-Girbes M, Valiente R i sur. Safety and tolerability of bilastine 10 mg administered for 12 weeks in children with allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27:493-498.
21. Ridolo E, Montagni M, Bonzano L, Incorvaia C, Canonica GW. Bilastine: new insight into antihistamine treatment. *Clin Mol Allergy.* 2015;13(1):1.
22. Church MK, Tiongco-Recto M, Ridolo E, Novak Z. Bilastine: a lifetime companion for the treatment of allergies. *Immunology.* 2019;36(3):445-454.
23. Bosma R, van den Bor J, Vischer HF, Labeaga L, Leurs R. The long duration of action of the second generation antihistamine bilastine coincides with its long residence time at the histamine H1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2018;838:107-111.
24. Jauregui I, Ramaekers JG, Yanai K, Farre M, Redondo i sur. Bilastine: a new antihistamine with an optimal benefit-to-risk ratio for safety during driving. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;15(1):89-98.
25. Antonijoan R, Coimbra J, Garcia-Gea C, Puentes M, Gich I i sur. 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(1):129-136.
26. Kreutner W, Hey JA, Anthes J, Barnett A, Young S, Tozzi S. Preclinical pharmacology of desloratadine, a selective and nonsedating histamine H1 receptor antagonist. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2000;50(4):345-352.
27. Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica.* 2020;50(6):733-740.
28. Kazmi F, Yerino P, Barbara JE, Parkinson A. Further characterization of the metabolism of desloratadine and its cytochrome P450 and UDP-



- glucuronosyltransferase inhibition potential: Identification of desloratadine as a relatively selective UGT2B10 inhibitor. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(9):1294-1302.
29. Nakamura T, Hiraoka K, Harada R, Matsuzawa T, Ishikawa Y, Funaki Y i sur. Brain histamine H1 receptor occupancy after oral administration of desloratadine and loratadine. *Pharmacol Res Perspect.* 2019;7(4):e00499.
30. Boer J, Ederveen E, Grundmark B. Desloratadine and depression, a drug safety signal based on worldwide spontaneous reporting of side effects. *Usp J Med Sci.* 2018;123(3):174-178.
31. Shawky RM, Seifeldin NS. The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects. *Egypt J Med Hum Genet.* 2015;16:287-290.
32. Hansen C, Desrosiers NS, Wisniewski K, Strickland MJ, Werler MM, Gilboa Sm. Use of antihistamine medications during early pregnancy and selected birth defects: The national birth defects prevention study, 1997–2011. 2020;112(16):1234-1252.
33. Källén B. Maternal use of antihistamine drugs for allergy and infant congenital malformations. Switzerland: Springer Nature, 2019. str. 383-388.
34. Zambelli-Weiner A, Via C, Yuen M, Weiner DJ, Kirby RS. First trimester ondansetron exposure and risk of structural birth defects. *Reprod Toxicol.* 2019;83:14-20.
35. Zhang Z, Zoltewicz JS, Mondello S, Newsom KJ, Yang Z, Yang B i sur. Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PLoS One.* 2014;9(3):e92698.
36. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:121-130.
37. Brenner M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Brain Pathol.* 1994;4:219-220.
38. Papa L, Brophy GM, Welch RD, Lewis LM, Braga CF, Tan CN i sur. Time course and diagnostic accuracy of glial and neuronal blood biomarkers GFAP and UCH-L1 in a large cohort of trauma patients with and without mild traumatic brain injury. *JAMA Neurol.* 2016;73(5):551-560.
39. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae.* 2015;7(2):42-47.
40. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ i sur. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Mol Neurobiol.* 2015;53(3):1637-1647.

41. Carrott L, Bowl MR, Aguilar C, Johnson SL, Chessum L, West M i sur. Absence of neuroplastin-65 affects synaptogenesis in mouse inner hair cells and causes profound hearing loss. *J Neurosci*. 2016;36(1):222-234.
42. Amuti S, Tang Y, Wu S, Liu L, Huang L, Zhang H i sur. Neuroplastin 65 mediates cognitive functions via excitatory/inhibitory synapse imbalance and ERK signal pathway. *Neurobiol Learn Mem*. 2016;127:72-83.
43. Li H, Liu Y, Gao X, Liu L, Amuti S, Wu D i sur. Neuroplastin 65 modulates anxiety- and depression-like behavior likely through adult hippocampal neurogenesis and central 5-HT activity. *FEBS J*. 2019;286(17):3401-3415.
44. Cremers C, Townley IK. Evolution of neuroplastin-65. *JEI*. 2016;1-7.
45. Bernstein HG, Smalla KH, Bogerts B, Gordon-Weeks PR, Beesley PW, Gundelfinger ED i sur. The immunolocalization of the synaptic glycoprotein neuroplastin differs substantially between the human and the rodent brain. *Brain Res*. 2007;1134(1):107-112.
46. Estrada LI, Robinson AA, Amaral AC, Giannaris EL, Heyworth NC, Mortazavi F i sur. Evaluation of long-term cryostorage of brain tissue sections for quantitative histochemistry. *J Histochem Cytochem*. 2017;65(3):153-171.
47. Vacca LL. *Laboratorijski priručnik za histokemiju*. 6. izd. New York: Raven press; 1985.
48. Mitani A, Shimokouchi M, Itoh K, Nomura S, Kudo M, Mizuno N. Morphology and laminar organization of electrophysiologically identified neurons in the primary auditory cortex in the cat. *J Comp Neurol*. 1985;235:430-447.
49. Moerel M, De Martino F, Ugurbil K, Yacoub E, Formisano E. Processing complexity increases in superficial layers of human primary auditory cortex. *Scientific Reports*. 2019;9:5502.
50. Qiu LR, Fernandes DJ, Szulc-Lerch KU, Dazai J, Nieman BJ, Turnbull DH i sur. Mouse MRI shows brain areas relatively larger in males emerge before those larger in females. *Nat Commun*. 2018;9:2615.
51. Rabinowicz T, Petetot J McD-C, Gartside PS, Sheyn D, Sheyn T, de Courten-Myers GM. Structure of the cerebral cortex in men and women. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(1):46-57.
52. Vitrac C, Benoit-Marand. Monoaminergic modulation of motor cortex function. *Front Neural Circuits*. 2017;11:72.

53. Yanai K, Hiraoka K, Karpati A, Naganuma F, Okamura N, Tashiro M i sur. Histamine H1 receptor occupancy in the human brain measured by positron emission tomography. U: Blandina P, Passani MB, urednici. Histamine receptors, 1. izd. Springer International Publishing Switzerland; 2016. str. 311-325.
54. Sanchez-Borges M, Ansotegui IJ. Second generation antihistamines: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2019;19:358-364.
55. Li H, Zeng J, Huang L, Wu D, Liu L, Liu Y i sur. Microarray analysis of gene expression changes in neuroplastin 65-knockout mice: Implications for abnormal cognition and emotional disorders. *Neurosci Bull.* 2018;34:779-788.
56. Hu Y, Zhan Q, Zhang H, Liu X, Huang L, Li H i sur. Increased susceptibility to ischemic brain injury in neuroplastin 65-deficient mice likely via glutamate excitotoxicity. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:110.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Katarina Mikulec

**Datum i mjesto rođenja:** 10. studenog 1996., Vinkovci

**Adresa stanovanja:** Ulica Ivana Zajca 30A, 32280 Jarmina

**Kontakt:** 095 883 9279

**E-mail:** mikuleckatarina@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2018. – 2021. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

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

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

2003. – 2011. Osnovna škola Matije Gupca u Jarmini

### **Sudjelovanje na projektima, kongresima i volontiranje:**

2020. – 2. Osječki studentski kongres - OSCON, 13.-14.02.2020.

2019. – kongresno izlaganje, 14. „Bridges in life“ internacionalna konferencija RECOOP HST udruženja (poster) i 2. Internacionalna studentska konferencija u Bratislavi, Slovačka: „2<sup>nd</sup> RECOOP-KFSD International Student Conference“ (predavanje), 10.-14.04.2019.

2019 - volonter na 18. Tjednu mozga održanim pod temom „Inteligencija životinja“, Osijek, Hrvatska, 11.-17.03.2019.

### **Sažeci u zbornicima i časopisima:**

1. **Mikulec K**, Zjalić M, Sztojkov-Ivanov A, Gaspar R, Vari SG, Heffer M, Ivić V. Alterations in rat cerebral cortex in offspring of bilastine-treated mothers. 16<sup>th</sup> RECOOP Bridges in Life Sciences Video Conference Book of Abstracts. Prunuchas E, Vari SG, Laureova S (ur.). Los Angeles: Cedars-Sinai Medical Center & RECOOP HST Association, 2021. str. 28-28 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni);

2. Majić, Ljiljana; Balog, Marta; **Mikulec, Katarina**; Lulić, Doris; Ivić, Vedrana; Heffer, Marija. Chronic stress alters expression of insulin and leptin receptors in the brain of aged male rats. RECOOP 14<sup>th</sup> Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP-KFSD International Student Conference 2019 Abstract Book. Vari, Sandor G. (ur.). Bratislava, Slovačka, 2019. str. 39-39 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni);
3. **Mikulec, Katarina**; Majić, Ljiljana; Zjalić, Milorad; Heffer, Marija. Changes in iron metabolism in the brain and liver of Sprague-Dawley rats exposed to fatty and sweet food. 2<sup>nd</sup> RECOOP-KFSD International Student Conference Book of Abstracts. Bratislava, Slovačka, 2019. str. 15-15 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).