



UNIVERZA V LJUBLJANI

VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.7.09:616.5-002:615.356:615.218:544.433.3(043.3)

mag. Alja Plevnik Kapun, dr. vet. med.

**VPLIV VITAMINA E NA OKSIDATIVNI STRES PRI PSIH Z  
ATOPIČNIM DERMATITISOM**

Doktorska disertacija

**INFLUENCE OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN DOGS  
WITH ATOPIC DERMATITIS**

PhD Thesis

Ljubljana, 2012

Alja Plevnik Kapun

VPLIV VITAMINA E NA OKSIDATIVNI STRES PRI PSIH Z ATOPIČNIM DERMATITISOM

Delo je bilo opravljeno na

Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnik

doc. dr. Alenka Seliškar, dr. vet. med.,

Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,

predstojnik znan. svet. prof. dr. Anton Vengušt, dr. vet. med.,

Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani,

predstojnik prof. dr. Janez Salobir.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne \_\_\_\_\_

Mentorica: doc. dr. Tina Kotnik, dr. vet. med.

Somentorica: doc. dr. Gabrijela Tavčar Kalcher, univ. dipl. kem.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Zlatko Pavlica, dr. vet. med.

članica: doc. dr. Alenka Nemeč Svete, univ. dipl. ing. kem. ing.

član: prof. dr. Tomaž Lunder, dr. med.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorand:

## VSEBINA

<b>OKRAJŠAVE</b> .....	<b>7</b>
<b>IZVLEČEK</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>13</b>
1.1 Namen raziskave.....	15
<b>2 PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>16</b>
2.1 Oksidativni stres in reaktivne kisikove zvrsti.....	16
2.2 Biološki učinki ROS.....	17
2.2.1 Lipidna peroksidacija.....	19
2.3 Antioksidanti.....	21
2.3.1 Vitamin E.....	22
2.3.2 Glutation peroksidaza.....	24
2.3.3 Superoksidna dismutaza.....	25
2.3.4 Celokupna antioksidantna kapaciteta.....	26
2.4 Oksidativni stresin antioksidanti pri atopičnem dermatitisu.....	28
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>31</b>
3.1 Živali.....	31
3.2 Vključitveni in izključitveni kriteriji.....	31
3.3 CADESI-03 sistem kliničnega vrednotenja.....	32
3.4 Diet.....	33
3.5 Uporabljeni zdravila.....	33
3.6 Postopek po vključitvi živali v raziskavo.....	34
3.7 Priprava krvnih in kožnih vzorcev.....	34
3.8 Hematološke preiskave.....	36
3.9 Biokemijske preiskave.....	36
3.10 Določanje celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompleksom TAS (TAC).....	37
3.11 Določanje celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompleksom PHOTOCHEM (TACBF).....	37
3.12 Določanje aktivnosti glutacione peroksidaze.....	37
3.13 Določanje aktivnosti superoksidne dismutaze.....	38
3.14 Določanje koncentracije MDA.....	38
3.15 Določanje koncentracije vitamina E v plazmi.....	38
3.16 Določanje koncentracije vitamina E v koži.....	39
3.17 Statistična analiza.....	40
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>41</b>
4.1 Živali vključene v raziskavo.....	41
4.2 Vrednosti hematoloških in biokemijskih parametrov.....	43
4.3 Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži, srbeža ter CADESI-03 točkovanja med skupino placebo ter skupino vitamin E pred pričetkom zdravljenja (obisk 1), med (obisk 2, 3, 4) in ob koncu zdravljenja (obisk 5).....	43
4.4 Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži med skupinama atopikov (placebo in vitamin E) in skupino zdravih psov pred pričetkom (obisk 1) in ob koncu zdravljenja (obisk 5).....	46
4.5 Grafični prikazi primerjav vrednosti vitamina E v koži, srbeža in CADESI-03 med posameznimi skupinami živali pred pričetkom zdravljenja (obisk 1), med zdravljenjem (obisk 2,3,4) in ob koncu zdravljenja (obisk 5).....	48
4.6 Število psov z določenimi kožnimi spremembami v placebo in vitamin E skupini po	52

CADESI-03 točkovanju.....	
<b>5 DISKUSIJA.....</b>	<b>54</b>
5.1 Antioksidantni status, vitamin E in MDA pri zdravih psih in psih z atopičnim dermatitisom pred začetkom zdravljenja.....	55
5.2 Antioksidantni status, vitamin E in MDA pri psih z AD med zdravljenjem.....	58
<b>6 SKLEP.....</b>	<b>62</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>64</b>
<b>8 SUMMARY.....</b>	<b>66</b>
<b>9 ZAHVALA.....</b>	<b>68</b>
<b>10 LITERATURA.....</b>	<b>69</b>
<b>11 PRILOGE.....</b>	<b>89</b>
11.1 Priloga 1: Anamnestični podatki.....	89
11.2 Priloga 2: Vključitveni kriteriji po Willemse-ju.....	91
11.3 Priloga 3: Prehrana psov z atopičnim dermatitisom.....	93
11.4 Priloga 4: Prehrana zdravih psov.....	93
11.5 Priloga 5: Fototabela.....	95
11.6 Priloga 6: Numerična skala za oceno srbeža.....	101
11.7 Priloga 7: Rezultati alergijskega testiranja.....	101
11.8 Priloga 8: Članek objavljen v reviji Research in Veterinary science.....	108

## KAZALO SLIK

<i>SLIKA 1: Primerjava vrednosti vitamina E v koži med skupinami pred zdravljenjem in ob koncu zdravljenja.....</i>	<i>49</i>
<i>SLIKA 2: Primerjava vrednosti srbeža med skupino placebo (zdravljeni s feksofenadinom in placebom) in skupino vitamin E (zdravljeni s feksofenadinom in vitaminom E) pred in med zdravljenjem.....</i>	<i>50</i>
<i>SLIKA 3: Primerjava vrednosti CADESI-03 med skupino placebo (zdravljeni s feksofenadinom in placebom) in skupino vitamin E (zdravljeni s feksofenadinom in vitaminom E) pred in med zdravljenjem .....</i>	<i>51</i>

## KAZALO TABEL

<i>TABELA 1: 29 psov, vključenih v raziskavo, naključno razvrščenih v placebo in vitamin E skupino, ter 17 zdravih psov.....</i>	<i>41</i>
<i>TABELA 2: Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži, srbeža ter CADESI-03 točkovanja med skupinama placebo in vitamin E ob 1., 2., 3., 4. obisku ter ob koncu zdravljenja (5. obisk).....</i>	<i>44</i>
<i>TABELA 3: Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži med skupino zdravih psov ter skupino placebo in vitamin E pred začetkom (obisk 1) in ob koncu zdravljenja (obisk 5).....</i>	<i>47</i>
<i>TABELA 4: Število psov v placebo skupini z določenimi kožnimi spremembami na določenem predelu telesa pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) ter ob koncu zdravljenja (obisk 5).....</i>	<i>52</i>
<i>TABELA 5: Število psov v vitamin E skupini z določenimi kožnimi spremembami na določenem predelu pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) ter ob koncu zdravljenja (obisk 5).....</i>	<i>53</i>

## OKRAJŠAVE

ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
AD	atopični dermatitis
BHT	butilhidroksitoluen
CADESI-03	angl. Canine Atopic Dermatitis Extent Severity Index
CAT	katalaza
CCl <sub>3</sub> OO <sup>•</sup>	halogenirani peroksidni radikal
COX	ciklooksigenaza
COX-2	ciklooksigenaza 2
CuZn-SOD	superoksidna dismutaza, ki vsebuje baker in cink
EC-SOD	ekstracelularna tetramerna superoksidna dismutaza
FRAP	angl. Ferric Reducing Antioksidant Potential
GPX	glutation peroksidaza
GPX2	gastrointestinalna glutation peroksidaza
GPX3	plazemska glutation peroksidaza
GPX4	fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza
GPX5	glutation peroksidaza 5
GPX6	glutation peroksidaza 6
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation (v reducirani obliki)
GSSG	glutationa (v oksidirani obliki)
GST	glutation-S-transferaza
HNE	4-hidroksinonenal
HPLC	angl. High-Performance Liquid Chromatography
IgE	imunoglobulin E
IL-4	interlevkin 4
IL-5	interlevkin 5
MDA	malondialdehid

Mn-SOD	superoksidna dismutaza, ki vsebuje mangan
NO <sup>•</sup>	dušikov oksid
NOS	sintaza dušikovega oksida
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksidni radikal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singletni kisik
•OH	hidroksilni radikal
OONO <sup>-</sup>	peroksinitrit
ORAC	angl. Oxygen Radical Absorbance Capacity
PH-GPX	fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl.Reactive Oxygen Species)
RS <sup>•</sup>	tijil
RSO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	tijil sulfonil
SOD	superoksid dismutaza
SCORAD	angl. SCORing Atopic Dermatitis
TAC	angl. Total Antioxidant Capacity (celokupna antioksidantna kapaciteta)
TEAC	angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
T <sub>H</sub>	T celice pomagalke
TPTZ-Fe <sup>3+</sup>	železov-tripiridiltriazinski kompleks
TRAP	angl. Total Radical-trapping Antioxidant Parameters

## VPLIV VITAMINA E NA OKSIDATIVNI STRES PRI PSIH Z ATOPIČNIM DERMATITISOM

### IZVLEČEK

**Ključne besede:** Pes, boleznj; dermatitis, atopični – zdravljenje z zdravili; oksidativni stres; antioksidanti – terapevtska raba; superoksidna dismutaza – kri; glutathion peroksidaza – kri; malondialdehid – kri; vitamin E – kri; psi

Namen raziskave je bil opredeliti izbranih parametrov antioksidantnega statusa, koncentracijo malondialdehida ter koncentracijo vitamina E pri psih z atopičnim dermatitisom (AD) in spremljanje teh parametrov ob dodajanju antioksidanta vitamina E v obdobju 8 tednov.

Šestindvajsetim psom z AD in 17 zdravim psov smo odvzeli vzorce krvi in kože za določitev parametrov antioksidantnega statusa (glutathion peroksidaza (GPX) v hemolizatu polne krvi, superoksidna dismutaza (SOD) v hemolizatu eritrocitov, celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC) v plazmi, koncentracijo malondialdehida (MDA) v plazmi ter vitamina E v plazmi in koži. Za določanje TAC smo uporabili dve različni metodi: z reagenčnim kompletom TAS (TAC) in z reagenčnim kompletom PHOTOCHEM (TACBF). Vzorce krvi smo psom z AD odvzeli pred pričetkom zdravljenja (dan vključitve) ter ob vsakem obisku v času 8-tedenskega zdravljenja (2., 4., 6. in 8. teden). Vzorce kože smo psom z AD odvzeli pred pričetkom zdravljenja (dan vključitve) in ob koncu zdravljenja (5. obisk). Psi z AD so bili dvojno slepo razdeljeni v dve skupini. Trinajst psov je prejelo antihistaminik *feksofenadin* v odmerku 18 mg/kg t.m. 1x dnevno in placebo v obliki mineralnega olja peroralno (placebo skupina). Skupina drugih trinajstih psov je prejela antihistaminik *feksofenadin* v odmerku 18 mg/kg t.m. 1x dnevno in antioksidant vitamin E v odmerku 8,1 IE/kg t.m. 1x dnevno peroralno (vitamin E skupina). Klinične spremembe na koži psov z AD smo v času pred pričetkom zdravljenja (dan vključitve) in v času zdravljenja (2., 4., 6. in 8. teden) ocenjevali s pomočjo CADESI-03 sistema točkovanja. Lastniki so s pomočjo vizualne analogne skale ob vsakem obisku ocenjevali stopnjo srbeža.

Pred pričetkom zdravljenja (1. obisk) nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama psov z AD pri nobenem od merjenih parametrov, kar pomeni, da sta bili naključno

izbrani skupini uravnoreženi. Rezultati raziskave so pokazali statistično značilno nižjo aktivnost GPX in statistično značilno večjo koncentracijo MDA, ter statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi pri obeh skupinah psov z AD v primerjavi s skupino zdravih. V začetku raziskave nismo ugotovili statistično značilnih razlik v aktivnosti superoksidne dismutaze (SOD), vrednosti celokupne antioksidantne kapacitete (TAC) in koncentraciji vitamina E v koži obeh skupin atopičnih psov v primerjavi s skupino zdravih. Med zdravljenjem smo že ob 2. obisku ugotovili statistično značilno višjo plazemsko koncentracijo vitamina E, statistično značilno višjo celokupno antioksidantno kapaciteto, (merjeno po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah - TACBF) in statistično značilno nižjo vrednost CADESI-03 pri vitamin E skupini v primerjavi s placebo skupino, kar je vztrajalo do konca zdravljenja. Vrednosti ostalih merjenih parametrov se v času zdravljenja med skupinama psov obolelih za AD niso statistično značilno razlikovale.

Ob koncu zdravljenja (5. obisk) smo ugotovili statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi psov placebo skupine v primerjavi s skupino zdravih psov, medtem ko razlika med vitamin E skupino in skupino zdravih psov ni bila več statistično značilna. Aktivnost GPX je bila ob koncu zdravljenja (5. obisk) pri obeh skupinah psov z AD še vedno statistično značilno nižja v primerjavi s skupino zdravih. Aktivnost SOD je bila statistično značilno višja pri vitamin E skupini v primerjavi s skupino zdravih psov. Koncentracija MDA je bila ob koncu zdravljenja pri placebo skupini še vedno statistično značilno višja v primerjavi s skupino zdravih psov, med tem ko statistično značilne razlike med vitamin E skupino in skupino zdravih psov ni bilo več. Ob 5. obisku nismo zasledili razlik v vrednostih TAC, TACBF in koncentracije vitamina E v koži skupin psov z AD v primerjavi s skupino zdravih.

Na osnovi vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, koncentracije MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži pred zdravljenjem in ob koncu zdravljenja sklepamo, da je oksidativni stres vključen v patogenezo AD psov in bi bila uporaba podporne terapije z vitaminom E kot antioksidantom smiselna.

## INFLUENCE OF VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN DOGS WITH ATOPIC DERMATITIS

### ABSTRACT

**Key words:** Dog diseases; dermatitis, atopic – drug therapy; oxidative stress; antioxidants – therapeutic use; superoxide dismutase – blood; glutathion peroxidase – blood; malondialdehyde – blood; vitamin E – blood; dogs

The purpose of this trial was to determine some of the parameters of antioxidant status, concentration of malondialdehyde and concentration of vitamin E in dogs with atopic dermatitis (AD), as well as influence of adding antioxidant vitamin E on these parameters in 8 weeks period.

Samples of blood and skin for determining parameters of antioxidative status (glutathione peroxidase (in hemolysate of whole blood), superoxide dismutase (in hemolysate of erythrocytes), total antioxidative capacity (in plasma), concentration of malonaldehyde (in plasma) and vitamin E (in plasma and skin), were collected from twenty-six dogs with AD and seventeen healthy dogs. For settings the total antioxidative capacity, we used two different methods: the reagent kit TAC and the reagent kit PHOTOCEM (TACBF). Samples of blood of atopic dogs were collected at the baseline (inclusion date), then at each visit for the duration of 8-week treatment period (2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week). Samples of skin of atopic dogs were collected at the baseline (inclusion date) and at the concluding of the treatment period (8<sup>th</sup> week). Blood and skin samples of healthy dogs were collected once. Clinical changes of atopic dogs' skin were assessed at the baseline (inclusion date) and for the duration of the treatment period (2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week) by using CADESI-03 scoring system. At each visit, owners have had assessed the grade of itching by using visual-analogue scale. Dogs with AD were divided by double-blinding into two groups. Thirteen dogs have had received antihistamine fexofenadine in the dose of 18 mg / kg b.m. once daily and placebo in form of mineral oil perorally (placebo group). The group of other thirteen dogs have had received antihistamine fexofenadine in the dose of 18 mg / kg b.m. once daily and antioxidant vitamin E in the dose of 8,1 IE / kg b.m. once daily perorally (vitamin E group).

At the baseline (visit 1.), we were not able to determine significant difference between groups of dogs with AD in any of the measured parameters which means, that selected groups were balanced. At the baseline (visit 1.), we were able to determine statistically significant lower activity of glutathion peroxidase (GPX) and statistically significant larger concentration of malonaldehyde (MDA), as well as statistically significant lower concentration of vitamine E in plasma in both of atopic dogs' groups in comparison to the group of healthy dogs. At the baseline we were not able to determine statistically significant difference in activity of superoxyde dismutase (SOD), level of total antioxidative capacity (TAC) and concentration of vitamine E in the skin of both groups of atopic dogs in comparison to the group of healthy dogs. During the treatment period, as early as at the time of the second visit, we have determined statistically significant higher plasma concentration of vitamin E, statistically significant higher total antioxidant capacity (using the method based on the fat-soluble antioxidants – TACBF) and statistically lower levels of CADESI-03 scores in the vitamin E group, compared to placebo group. These differences persisted until the conclusion of the treatment period. Levels of the rest of the measured parameters were not statistically different between the two groups of atopic dogs.

At the conclusion of the treatment period (8<sup>th</sup> week) we have determined statistically significant lower concentration of vitamin E in plasma of placebo group in comparison to the group of healthy dogs, while the difference between vitamin E group and the group of healthy dogs was not statistically significant. Activity of GPX was statistically significantly lower in both groups of atopic dogs in comparison to the group of healthy dogs. Activity of SOD was statistically significantly higher in vitamin E group in comparison to the group of healthy dogs. Concentration of MDA was statistically significantly higher in placebo group compared to the group of healthy dogs, while statistical significance between vitamin E group and the group of healthy dogs was no longer existing. We were not able to determine differences in levels of TAC, TACBF and concentration of vitamin E in skin of atopic dogs compared to the group of healthy dogs.

Based on the levels of parameters of antioxidative status, concentration of MDA and concentration of vitamin E in plasma and skin before treatment and at the end of the treatment, we can conclude possible involvement of oxidative stress into the pathogenesis of dogs with AD, therefore proving supportive therapy with vitamin E as a sensible treatment option.

## 1 UVOD

Atopija je genetska sposobnost organizma, da razvije protitelesa tipa IgE na alergene iz okolja, kar se pokaže v kombinaciji takojšnjih in zapoznelih alergijskih kliničnih znakov (Sousa, 1988; Hillier in Griffin, 2001; Hillier, 2002; Roosje, 2005; Tarpataki in sod., 2006). Glavni tarčni organ pri atopiji psov je koža in poglavitna klinična znaka sta vnetje in srbež kože. Od tukaj izvira definicija, da je atopični dermatitis genetsko pogojeno vnetno in srbeče alergijsko obolenje kože z značilnimi kliničnimi znaki, povzročenimi z razvojem IgE protiteles na alergene iz okolja. Raziskave Olivry-ja (Olivry in sod., 1997) in sodelavcev v poznih devetdesetih letih so pokazale, da alergeni verjetno vstopajo pretežno preko kože. Atopični dermatitis je vsesplošno prepoznano in takoj za preobčutljivostjo na boljše pike, drugo najpogostejše alergijsko obolenje kože pri psih. Za to boleznijo oboleva po svetu približno 10 % psov (Hillier in Griffin, 2001; Hillier, 2002; Roosje, 2005; Tarpataki in sod., 2006). Ta podatek je samo približna ocena, saj veliko psov nikoli ne obiše veterinarja; bodisi imajo blago obliko bolezni brez očitnih kliničnih znakov ali pa se ti kažejo v obliki vnetja zunanjega sluhovoda, česar veterinarji velikokrat ne pripišejo atopičnemu dermatitisu (Roosje, 2005; Favrot, 2009).

Za vnetje kože pri atopičnem dermatitisu je značilna intenzivna infiltracija limfocitov in eozinofilnih granulocitov. Te celice sproščajo pro-vnetne citokine in reaktivne kisikove zvrsti (ROS - Reactive Oxygen Species) kot na primer superoksidni radikal, vodikov peroksid in peroksinitrit (Portugal in sod., 2007). Povečana količina ROS vodi v stanje oksidativnega stresa, ki prispeva k razvoju rdečine, otekline, vnetja, preobčutljivosti in keratinizacije kože pri atopičnem dermatitisu (Nachbar in Korting, 1995). Viri v literaturi navajajo, da ROS sodelujejo v patogenezi alergijskega vnetja, zato je lahko povečana proizvodnja ROS eden od dejavnikov, ki prispevajo k poškodbi tkiva pri atopičnem dermatitisu (Tsuboi in sod., 1998; Briganti in Picardo, 2003; Tsukahara in sod., 2003). Organizmi so v boju proti ROS razvili obrambni mehanizem, ki je sestavljen iz dveh glavnih skupin antioksidantov; to je skupina antioksidantnih encimov, v katero spadajo superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX) in glutation reduktaza (GSH) (Valko in sod., 2007) in skupina neencimskih antioksidantov, v katero spadajo vitamin E, vitamin B in številni drugi. Vitamin E je najbolje zastopan v koži in sicer v celičnih membranah, kjer zagotavlja obrambo pred lipidno peroksidacijo, katero povzročajo prosti radikali. Povečana lipidna peroksidacija lahko spodbudi imunski in vnetni odziv (Mates in sod., 1999).

Pri ljudeh je dokazana vzročna povezava med atopičnim dermatitisom in oksidativnim stresom. Veliko je tudi napisanega o vplivu antioksidantov, zlasti vitamina E, na izboljšanje porušenega antioksidantnega statusa in s tem na oksidativni stres v smislu podpornega zdravljenja atopičnega dermatitisa pri ljudeh. V literaturi s področja veterinarske medicine lahko zasledimo podatke o nastanku oksidativnega stresa pri nekaterih boleznih psov, kot so rakasta obolenja, obolenja jeter, bolezni gastrointestinalnega trakta, kognitivne disfunkcije in podobno. V obstoječi literaturi nismo zasledili podatkov o antioksidantnem statusu psov z atopičnim dermatitisom kot tudi ne o morebitni vpletenosti oksidativnega stresa v patogenezo atopičnega dermatitisa pri psih. Prav tako v literaturi nismo zasledili podatkov o smiselnosti podporne terapije z vitaminom E pri zdravljenju atopičnega dermatitisa pri psih.

## **1.1 Namen raziskave**

Namen raziskave je bil ugotoviti ali je antioksidantni status pri psih z atopičnim dermatitisom porušen in ali je podporna terapija z vitaminom E smiselna.

### ***Z raziskavo smo želeli:***

- ovrednotiti koncentracijo vitamina E v plazmi in koži psov z atopičnim dermatitisom v primerjavi z zdravimi psi;
- ovrednotiti parametre antioksidantnega statusa (superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPX) in celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC)) pri psih z atopičnim dermatitisom v primerjavi z zdravimi psi;
- ovrednotiti koncentracijo malondialdehida (MDA), kot pokazatelja obsega lipidne proksidacije pri psih z atopičnim dermatitisom v primerjavi z zdravimi psi;
- ovrednotiti smiselnost uporabe vitamina E, kot podporne terapije pri zdravljenju atopičnega dermatitisa psov in njegovo uvrstitev v vsakodnevno klinično prakso.

### ***Namen raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:***

Ali ima oksidativni stres vlogo v patogenezi atopičnega dermatitisa in ali je podporna terapija z vitaminom E smiselna.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 Oksidativni stres in reaktivne kisikove zvrsti

Oksidativni stres (OS) vključuje vsa stanja, v katerih se koncentracija ROS poveča, vendar ne gre samo za delovanje ROS saj se oksidativni stres pojavi tudi kot posledica izrabe antioksidantne zaščite, kar vodi v porušenje ravnovesja med ROS in antioksidantnim obrambnim mehanizmom v organizmu. (Halliwell, 1994; Stohs, 1995; Droge, 2002).

Med ROS spadajo reaktivne kisikove spojine, kot so vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ) in hipoklorna kislina (HOCl) in prosti radikali, kot na primer superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoksidni radikal ( $OH_2^{\bullet}$ ), hidroksilni radikal ( $^{\bullet}OH$ ) in nekateri drugi (Halliwell in Cross, 1994; Halliwell in Gutteridge, 1999). Prosti radikali so atomi, ioni, molekule ali njihovi deli, oziroma katerakoli kemična vrsta, ki je sposobna obstajati samostojno in, ki ima vsaj na enem od energetskih nivojev en nesparjen elektron (Bresjanac in sod., 1996; Wink in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999). Pomembni oksidanti so tudi reaktivne dušikove zvrsti, kot sta na primer dušikov oksid ( $NO^{\bullet}$ ) in peroksinitrit ( $OONO^{\bullet}$ ) (Halliwell in Cross, 1994; Halliwell in Gutteridge, 1999). Če t.i. primarni ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$ ,  $H_2O_2$ ) reagirajo z makromolekulami (DNA, lipidi, beljakovine), to vodi v nastanek sekundarnih ROS (hidroperoksidni, alkoksilni in peroksilni radikali) (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Reaktivne kisikove zvrsti neprekinjeno nastajajo v mitohondrijih kot posledica aerobnega metabolizma, v procesih fagocitoze, pri razgradnji maščobnih kislin v peroksisomih, pri biorazgradnji različnih zdravil, pri vnetju ter pod vplivom ultravijoličnega (UV) in ionizirajočega sevanja. Ker je mitohondrijska respiratorna veriga glavni vir ROS v celici, je ravno bližina in občutljivost mitohondrijske DNA (mDNA) na poškodbe, ki jih povzroča ROS, tisti mehanizem, ki privede celice do oksidativnega stresa. Povrhu vsega se tam nahaja tudi ogromno nizkomolekularnih  $Fe^{2+}$  kompleksov (Cejas in sod., 2004). V teh pogojih lahko pride do poškodbe in mutacije DNA, RNA ter poškodbe beljakovin in lipidnih komponent (Halliwell in Gutteridge, 1999; Mates in sod., 1999; Behrend in sod., 2003; Pelicano in sod., 2004).

V fizioloških pogojih so glavni vir ROS v celicah:

- ⇒ mitohondriji, ki tvorijo superoksidni anion in vodikov peroksid (kot posledica normalnega dihanja);

- ⇒ aktivirani fagociti, ki tvorijo dušikov oksid, hipoklorno kislino in superoksidni anion v procesih fagocitoze;
- ⇒ peroksisomi, ki razgrajujejo maščobne kisline in druge substance, pri čemer nastaja vodikov peroksid;
- ⇒ citokrom P-450, ki je odgovoren za oksidacijo številnih endogenih in eksogenih spojin (Khansari in sod., 2009; Klauning in sod., 2010).

Zaradi prisotnosti neparnega elektrona so prosti radikali nestabilne, zelo reaktivne molekule, ki z lokalnim delovanjem (kar je bodisi oddajanje bodisi sprejemanje elektrona od drugih molekul) dosežejo bolj stabilno kemično stanje. Večina molekul, s katerimi prosti radikali reagirajo, nima teh lastnosti. Reakcija radikala z »neradikalom« (vse biološke makromolekule, kot so lipidi, proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in ostale molekule so možne »tarče«) sproži verižno reakcijo nastajanja novih prostih radikalov, ki lahko reagirajo z drugimi molekulami. Verižna reakcija se tako nadaljuje, pri čemer lahko pride do oksidativnih poškodb »tarčnih« molekul (Droge, 2002).

## 2.2 Biološki učinki ROS

Reaktivne kisikove zvrsti delujejo znotraj celic in zunaj njih, spremembe pa vodijo v različne bolezni, povzročajo staranje in odmiranje celic (Vajdovich, 2001, Valko in sod., 2007).

Nizke koncentracije ROS so pomembne za obrambo pred patogenimi mikrobi, za intracelularno signaliziranje, aktivacijo transkripcije, proliferacijo, apoptozo in kontrolo celičnega redoks potenciala (Cejas in sod., 2004). Ta je posledica ravnotežja med oksidanti (ROS) in reducenti (antioksidanti). Visoke koncentracije ROS pa vodijo v oksidativne poškodbe lipidov, beljakovin in DNA (Valko in sod., 2007).

Biološka aktivnost ROS v organizmu je odvisna od relativnega ravnotežja z antioksidantnim obrambnim sistemom organizma (Valko in sod., 2007).

Na ravni maščob (predvsem polinenasičenih maščobnih kislin v celični membrani, kot sta arahidonska in linolenska kislina) ROS sprožijo nastanek reaktivnih aldehydov, ki so stabilni in lahko uhajajo iz celice ter sodelujejo pri poškodbah DNA in beljakovin (Marnett, 1999; Blair, 2001; Niedernhofer in sod., 2003). Peroksidacija membranskih lipidnih molekul, t. i. lipidna peroksidacija, pripelje do sprememb nekovalentnih vezi v membranskem dvosloju in posledično do lokalne destabilizacije membrane (Cejas in sod., 2004), prizadene pa tudi

aktivnost membranskih encimov (Imai in Nakagawa, 2003). Lipidno peroksidacijo sprožajo hidroksilni radikali ter lipooksigenaza in ciklooksigenaza (COX), katerih aktivnost je regulirana z njunimi lastnimi produkti (Blair, 2001; Imai in Nakagawa, 2003).

Na ravni DNA so možne številne spremembe: oksidacija baz, enojni ali dvojni prelomi in povezave med verigami DNA (Niedernhofer in sod., 2003). Do posledičnih mutacij pride zaradi sprememb baz DNA, motenj v delovanju DNA-polimeraze (ta je zelo občutljiva na napake, ki se pojavljajo na gvaninu, ki je primarni cilj singletnega kisika) ali konformacijskih sprememb DNA vijačnice (Mates in Sanchez-Jimenez, 2000). Posledica je aktivacija ali supresija signalnih poti in ekspresije genov, kar lahko vodi v celično smrt (apoptoza) ali v aktivacijo nekaterih proto-onkogenov in /ali inaktivacijo nekaterih tumor-supresorskih genov (Halliwell in Gutteridge, 1999; Mates in sod., 1999; Behrend in sod., 2003; Pelicano in sod., 2004). Celica lahko poskrbi za popravilo napak jedrne DNA (nDNA), ne pa tudi sporočilne DNA (mDNA), zato se napake na slednji kopičijo in sčasoma vodijo do uničenja mitohondrijev in posledično do smrti celic ter s tem do staranja organizma (Valko in sod., 2007).

Na ravni beljakovin ROS povzročijo oksidativne spremembe stranskih verig aminokislin ali cepljenje beljakovinske molekule, npr. proteina p53, ciklooksigenaze-2 (COX-2) ter številnih drugih encimov in konstitutivnih beljakovin (Cejas in sod., 2004). Oksidirane beljakovine odstranjujejo različne proteaze (Ames in sod., 1993).

Delovanje ROS je lahko akutno ali kronično, generalizirano ali organsko specifično (Vajdovich, 2001).

V homeostazi prosti radikali sodelujejo pri regulaciji celičnih funkcij, prekomerno nastajanje prostih radikalov pa je povezano s patogenezo številnih bolezni kot so na primer bolezni srca in ožilja ter rak (Flitter, 1993; Guyton in Kensler, 1993; Valko in sod., 2007). Druge pogosto omenjene bolezni, povezane z oksidativnim stresom pri ljudeh so sladkorna bolezen, ishemija, revmatoidni artritis (Wolff, 1993; Droge, 2002), kronično vnetje prebavil in črevesja ter druga vnetja (Winrow in sod., 1993), obolenja jeter (Jackson in O'Farrell, 1993; Poli, 1993), ledvic (Baud in Ardaillou, 1993), pljuč in dihalnega trakta (Ryrfeldt in sod., 1993), cistična fibroza, virusna obolenja, poškodbe mišic (Jackson in O'Farrell, 1993), prezgodnje staranje (Nohl, 1993), motnje in poškodbe možganov in živčnega sistema, nevrodegenerativna obolenja (npr. Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen) (Evans, 1993; Droge, 2002), multipla skleroza (Evans, 1993) in druge.

### 2.2.1 Lipidna peroksidacija

Z biološkega stališča pomembna verižna reakcija prostih radikalov, ki povzroči oksidacijo lipidnih molekul, se imenuje lipidna peroksidacija (Halliwell in Chirico, 1993). Je serija kemičnih reakcij, ki vključuje oksidativne spremembe polinenasičenih maščobnih kislin, kar privede do spremembe celične strukture in funkcije (Halliwell in Gutteridge, 1989; Duthie, 1993), prizadene pa tudi aktivnost membranskih encimov (Imai in Nakagawa, 2003). Mehanizem lipidne peroksidacije ima tri stopnje: iniciacijo oz. začetek nastajanja prostih radikalov, propagacijo, kjer prosti radikali vstopajo v reakcije, produkti, ki pri tem nastajajo pa se cepijo naprej ter terminacijo, ki vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega produkta (Gordon, 1990; Halliwell in Chirico, 1993).

Do neke mere je t.i. kontrolirana lipidna peroksidacija zaželena in sicer v postopkih diferenciacije in dozorevanja celic, pri fagocitozi, prenosu intracelularnih veziklov in pri predstavitvi antigenov (Cejas in sod., 2004). V vseh ostalih primerih je lipidna peroksidacija škodljiva in povzroča poškodbe celičnih membran.

V procesu lipidne peroksidacije nastaja iz večkrat nenasičenih maščobnih kislin vrsta produktov, od aldehydov, ketonov, ogljikovodikov, epoksidov, do prostih radikalov. Določanje koncentracije produktov lipidne peroksidacije, na primer malondialdehida (MDA), F<sub>2</sub>-isoprostanov, 4-hidroksinonenala (HNE) in 4-hidroksiheksenala, je tudi eden izmed načinov določanja oksidativnega stresa. Najpogosteje obravnavani in merjeni produkt je MDA (Esterbauer in sod., 1991; Gallaher in sod., 1993). Nastanek MDA je možen preko različnih komponent: cikličnih peroksidov, hidroperoksilnih epidioksidov, bicikličnih endoperoksidov (Esterbauer in sod., 1991). Ker pa MDA ne nastaja samo pri nekontrolirani "avtooksidaciji" lipidov, ampak tudi v metabolizmu prostaglandinov (Basu in Marnett, 1983; Halliwell in Chirico, 1993), določena količina MDA nastaja tudi v normalnih pogojih in so majhne koncentracije MDA v tkivih, telesnih tekočinah in seču vedno prisotne.

MDA je zelo reaktivna molekula za katero predvidevajo, da je karcinogena, mutagena, toksična za jetrne celice in da je pobudnik različnih nezaželenih reakcij. Reagira lahko z lipidi in beljakovinami, inaktivira ribonukleaze ter druge encime in se kovalentno veže na nukleinske kisline. Inkubacija kožnih fibroblastnih celic z MDA je povzročila citoplazemsko vakuolizacijo, tvorbo satelitskih jeder in redukcijo beljakovinske sinteze v celicah. MDA povzroči kromosomske napake v razvitih celicah sesalcev (Shamberger in sod., 1974; Yau, 1979; Basu in Marnett, 1983; Del Rio, 2005). Domnevajo, da fluorescentni produkti

starostnega pigmenta lipofuscina nastanejo z interakcijo med MDA in lipidno-beljakovinskim kompleksom pigmenta (Chio in Tappel, 1969).

Za beljakovine je MDA nevaren, ker reagira z njihovimi tiolnimi skupinami, se navzkrižno veže z amino skupinami in ne nazadnje povzroči agregacijo beljakovin (Rice-Evans in sod., 1991).

Uporaba imunocitoloških metod za protitelesa, specifična za MDA- ali 4- hidroksinonenal lizin (HNE-lizin) beljakovinske komplekse, je pokazala, da se modifikacija beljakovin z aldehydi pojavi tudi v kultiviranih humanih fibroblastih, izpostavljenih askorbinski kislini. Sproži se namreč lipidna peroksidacija in stimulira ekspresijo kolagena. Lastna protitelesa, delujoča proti beljakovinom, ki so modificirane z aldehydi, naj bi predstavljala del lastnega obrambnega mehanizma, katerega naloga je odstranjevanje z aldehydi poškodovanih beljakovin. Odkritje teh protiteles je hkrati dalo prvi resnejši dokaz, da do poškodbe beljakovin s produkti lipidne peroksidacije v resnici prihaja (delali so v *in-vivo* pogojih) in da le-ti igrajo pomembno vlogo v patogenezi človeških bolezni (npr. ateroskleroza) (Esterbauer in sod., 1991).

Številne genotoksične substance, vključno s karcinogeni, lahko sprožijo lipidno peroksidacijo. Endogeno nastali produkti lipidne peroksidacije (MDA, HNE in ostali) pa lahko reagirajo z bazami DNA in izzovejo mutacije. Poleg tega produkti lipidne peroksidacije lahko inhibirajo sistem za odpravljanje napak na DNA in tako povečujejo hitrost spontanij mutacij. Čeprav *in-vivo* redko prihaja do modifikacije baz DNA ali same DNA z MDA ter ostalimi aldehydi, aldehydi lahko povzročijo številne genotoksične efekte, vključno z mutacijami, in tako sprožijo nastanek tumorjev (Esterbauer in sod., 1991). Esterbauer (1991) povzema, da je MDA mutagen tako za bakterijske celice kot celice sesalcev ter karcinogen za glodavce.

Številne raziskave dokazujejo, da obstaja pozitivna povezava med razvojem nekaterih bolezenskih stanj pri ljudeh in živalih in visokimi koncentracijami MDA v organizmu (Gallaher in sod., 1993; Guichardant in sod., 1994; Özben in sod., 1995; Bermejo in sod., 1997; Bianchi in sod., 1997; Huang in sod., 1999; Pesillo in sod., 2004; Simsek in sod., 2006; Crnogaj in sod., 2010).

Zaradi delovanja večjih količin prostih radikalov prihaja do povečanega obsega lipidne peroksidacije, posledica le-te je nastanek večjih količin MDA. Da preprečimo nastanek MDA, je potrebno odstraniti proste radikale, za to pa so potrebni antioksidanti. Določeno antioksidantno zaščito ima organizem sam po sebi, če pa ta ne zadošča, je potrebno antioksidante dovajati s hrano. Vrsta raziskav je pokazala, da se koncentracija MDA v telesu

(v plazmi, seču) zmanjša, če se hrani dodajajo antioksidanti (Huh in sod., 1994; Cadenas in sod., 1996; Lubec in sod., 1997; Dixon in sod., 1998; Avellini in sod., 1999).

## 2.3 Antioksidanti

Človeški in živalski organizem ima več celičnih mehanizmov, ki uravnavajo nivo ROS in tako preprečujejo njihove negativne učinke na celice. Antioksidantni obrambni sistem, ki organizem oziroma celice ščiti pred negativnimi učinki ROS, se je razvil skozi evolucijo, kot odgovor na povečano koncentracijo kisika v atmosferi (Gutteridge, 1994; Halliwell in Cross, 1994; Halliwell in Gutteridge, 1999).

Antioksidant je vsaka snov, ki je sposobna že v zelo nizki koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno upočasniti ali zavreti oksidacijo substrata (Gutteridge, 1994).

Na podlagi načina delovanja jih Chapple (1997) deli v tri glavne skupine:

- »Preventivni antioksidanti« preprečujejo tvorbo novih reaktivnih kisikovih zvrsti tako, da vežejo nase ione kovin prehoda, kot sta na primer železo in baker; ti antioksidanti so ceruloplazmin, metalotionin, albumin, mioglobin, feritin in transferin.
- »Antioksidanti lovilci« so donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden ti reagirajo z drugimi molekulami. S tem ko odstranjujejo že nastale ROS, preprečijo verižne reakcije nastajanja prostih radikalov. Med antioksidante lovilce prištevamo tiolne spojine (reduciran glutation (GSH)), tioredoksin, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), vitamin C (askorbinska kislina),  $\beta$ -karoten, urat in bilirubin.
- »Encimski antioksidanti« se nahajajo predvsem v celicah (Chapple, 1997), kjer odstranjujejo superokside in perokside, preden se ti v reakcijah s kovinskimi ioni pretvorijo v še aktivnejše spojine (Mates in sod., 1999; Mates, 2000). V to skupino sodijo glutation peroksidaza (GPX), katalaza (CAT), superoksid dismutaza (SOD), glutation reduktaza (GR) in glutation-S-transferaza (GST) (Chapple, 1997).

Nekatere antioksidante sintetizira telo samo, to so tako imenovani endogeni antioksidanti, med katere spadajo tako encimski kot tudi neencimski antioksidanti. Encimski antioksidanti, ki jih telo proizvaja samo, so CAT, GPX, SOD, GR in tioredoksin reduktaza. Neencimski endogeni antioksidanti pa so glutation, tioredoksin, ubikinon ali koencim Q<sub>10</sub>, sečna kislina, albumin, bilirubin in nekateri drugi (Gutteridge 1994; Mates, 2000; Valko in sod., 2007).

Ostale antioksidante mora človeški organizem dobiti s hrano, to so vitamin E, vitamin C, karotenoidi, fenoli ter žveplove spojine.

### 2.3.1 Vitamin E

Vitamin E je ime za skupino osmih, kemično zelo podobnih in v maščobah topnih substanc: štirih tokoferolov in štirih tokotrienolov, vendar lahko le  $\alpha$ -tokoferol v znatni meri inhibira lipidno peroksidacijo tako, da prekinja verižno reakcijo. Ostale oblike se slabše absorbirajo iz črevesja, zato so manj pomembne (Goss-Sampson in sod., 1989; Meydani, 1995; Nachbar in Korting, 1995; Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996; Wolf in sod., 1998; Brigelius-Flohe in Traber, 1997).

Vitamin E spada med fenolne antioksidante. V notranjost membrane se zasidra z interakcijo svoje stranske verige z membranskimi lipidi in tako stabilizira membrano (Goss-Sampson in sod., 1989) ter jo zaščiti pred oksidativnimi poškodbami (Devereux in Seaton, 2005). Membrane struktur, ki so še posebej izpostavljene oksidativnemu stresu, vsebujejo večje koncentracije vitamina E:

- ⇒ eritrociti (vsebujejo 1 molekulo vitamina E/500 molekul arahidonske kisline (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996);
- ⇒ mitohondriji (vsebujejo 1 molekulo vitamina E/2100 molekul fosfolipidov (Halliwell in Gutteridge, 1989) oziroma kar 60% vitamina E celice (Štalcer in Ploj, 1993);
- ⇒ celice očesne mrežnice, ki so močno izpostavljene kisiku;
- ⇒ celice nadledvične žleze (zaradi veliko oksigenaz) idr..

Vitamin E je najmočnejši naravni antioksidant. Raziskave dodajanja vitamina E k prehrani so dokazale zaščitno vlogo pri nekaterih bolezenskih stanjih, kot so bolezn srca (Burton, 1994), Alzheimerjeva bolezen (Sano in sod., 1997) in atopični dermatitis pri ljudeh (Tsourelis-Nikita in sod., 2002; Javanbakht in sod., 2010). Vitamin E je eden izmed najmočnejših lovilcev

prostih radikalov, njegovo najmočnejše delovanje pa je v membranah. Reagira s singletnim kisikom, s superoksidom oziroma verjetno pretežno z njegovo protonirano obliko, s hidroksilnim radikalom, reducira baker med oksidacijo lipidov, njegova najpomembnejša vloga pa je reakcija s sekundarnimi peroksilnimi in alkoksilnimi radikali, pri čemer tvori manj reaktiven tokoferilni radikal (Halliwell in Gutteridge, 1989; Halliwell, 1994; Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996; Traber, 1997). Ker lipidni peroksilni radikali reagirajo s tokoferolom veliko hitreje kot z lipidi, lahko ena molekula vitamina E zaščiti kar  $10^3$ – $10^8$  molekul polinenasičenih maščobnih kislin pri nižjih koncentracijah peroksidov (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996). Reakcija s peroksilnim radikalom, ki mu  $\alpha$ -tokoferol prispeva vodik in tako pretrga verižno reakcijo, je torej izredno hitra. Sam pri tem pridobi en elektron brez para, vendar je kot prosti radikal bolj stabilen, ker se prosti elektron lahko nahaja v aromatskem obroču (Halliwell in Gutteridge, 1989). Včasih se sam razgradi (srečanje dveh radikalov), a je to izjemno redko, saj se molekule vitamina E v membrani običajno nahajajo predaleč druga od druge. Običajno ga regenerira askorbat ali GSH (Darley-Usmar in Halliwell, 1996; Halliwell in Gutteridge, 1989; Pečar, 1991; Stohs, 1995). Regeneracija poteka blizu površine membrane, saj askorbat zaradi svoje polarnosti ne vstopa vanjo. Lipidna peroksidacija verjetno tako spremeni kemične lastnosti  $\alpha$ -tokoferola, da se pomika proti površini, kjer askorbat (enako ubikinon ali GSH; po mnenju nekaterih avtorjev tudi karotenoidi in flavonoidi) odda vodik tokoferilnemu radikalju. Askorbat se nato encimsko reducira v številnih procesih presnove (v sistemih z nikotinamidadenin dinukleotidom (NADH)). Pri nadaljnji oksidaciji  $\alpha$ -tokoferola se obroč B odpre in nastane  $\alpha$ -tokoferil kinon. Ta reakcija je sicer ireverzibilna in običajno ne poteče (razen pri reakciji s singletnim kisikom) (Rice-Evans in Burdon, 1994).

Tudi antioksidantno delovanje na lipidno peroksidacijo, 'povzročeno' s  $\text{Cu}^{2+}$  ni enako pri vseh tokoferolih. Sposobnost zaviranja peroksidacije pada v vrsti  $\alpha$ -tokoferol >  $\beta$ -tokoferol >  $\gamma$ -tokoferol >  $\delta$ -tokoferol (Miura in sod., 1995; Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996).

Zaradi svojega antioksidantnega delovanja vitamin E ščiti kožo pred škodljivimi vplivi oksidativnega stresa (Nachbar in Korting, 1995). Je pomemben sestavni del sebuma in se nenehno izloča na površino kože. Zaradi visoke vsebnosti maščob v poroženeli plasti se od lipofilnih antioksidantov, kot je  $\alpha$ -tokoferol pričakuje, da igrajo pomembno vlogo pri odstranjevanju reaktivnih kisikovih zvrsti med oksidativnim stresom. Poroženela plast je nenehno izpostavljena oksidantom iz okolja, vključno onesnaževalcem zraka, ultravijoličnemu (UV) sevanju, oksidantom, ki se sprostijo kot posledica normalne presnove,

parazitom in aerobnim mikroorganizmom (Thiele in sod., 1999; Thiele, 2001; Antille in sod., 2002; Thiele in Ekanayake-Mudiyanselage, 2007). Ultravijolično sevanje lahko tudi povzroči, da tkiva proizvajajo reaktivne kisikove zvrsti, eikosanoide in citokine. Vitamin E ščiti pred fotopoškodbami, povzročenimi z UV žarki, tako s svojim antioksidantnim delovanjem kot tudi z UV-vpojnimi lastnostmi (Krol in sod., 2000).

Kot odziv na prehransko dodajanje vitamina E, se koncentracija le tega pri ljudeh takoj poveča v plazmi, medtem ko je povečanje koncentracije v sebumu zaznati šele po sedmih dneh (Vaule in sod., 2004). To povezujejo s tvorbo sebuma, saj se lipidi, ki se izločajo s sebumom na novo sintetizirajo vsakih 8 dni (Downing in sod., 1981). Transport vitamina E v kožo je specifičen glede na izomere, tako se obe obliki naravnega (RRR- $\alpha$ -tokoferol) in sintetičnega (all-RAC- $\alpha$ -tokoferol) vitamina E pojavljata v krvnem obtoku, medtem ko se samo naravna oblika vitamina E (RRR- $\alpha$ -tokoferol) pojavlja v sebumu (Vaule in sod., 2004). Razlaga je v posebnem proteinu, ki selektivno transportira le eno izomero vitamina E v sebum (Hosomi in sod., 1997). Raziskave na človeški koži so pokazale, da je koncentracija vitamina E v različnih delih kože različna in sicer je najvišja v dermisu in najnižja v roženi plasti kože (Shindo in sod., 1994). Poleg tega so pri ljudeh dokazali tudi regionalne razlike vsebnosti vitamina E v koži. Koža obraza vsebuje višjo raven vitamina E, kot koža na neosvetljenih delih telesa npr. koža nadlahti (Thiele in sod., 1998). Ta regionalna raznolikost v koncentraciji vitamina E je podprta z dejstvom, da se vitamin E izloča s sebumom preko lojnic, zato področja z večjim številom lojnic in posledično višjo koncentracijo sebuma, kažejo višjo koncentracijo vitamina E (Lang in sod., 1986; Thiele in sod., 1999; Vaule in sod., 2004).

### **2.3.2 Glutation peroksidaza**

Glutation peroksidaza (GPX) predstavlja prvo linijo obrambe pred ROS. GPX je skupno ime za več sorodnih encimov, ki imajo v aktivnem mestu aminokislino selenocistein. Ta se v zaporednih reakcijah najprej oksidira in potem reducira (Imai in Nakagawa, 2003). Glutation peroksidaza katalizira redukcijo različnih hidroperoksidov (ROOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pri čemer uporablja glutation, ki pri tem prehaja iz reducirane (GSH) v oksidirano (GSSG) obliko (Mates in Sanchez-Jimenez, 2000). Glutation reduktaza katalizira nastanek GSSG iz dveh molekul GSH (Jefferies in sod., 2003), kjer NADPH služi kot reducent (Halliwell in Cross, 1994). Družino glutacion peroksidaz sestavljajo 4 encimi: (1) klasična celična GPX ali GPX1 reducira le topne hidroperoksidi in nekatere organske hidroperoksidi ter se nahaja v citoplazmi (70%) in mitohondrijih (30%) večine tkiv, največ pa je v eritrocitih, ledvicah in

jetrih (Mates in sod., 1999), (2) gastrointestinalna GPX ali GPX2, ki poleg topnih hidroperoksidov reducira tudi hidroperokside maščobnih kislin ter se nahaja v citoplazmi celic gastrointestinalnega trakta pri miših (Chu in sod., 1993) in v celicah jeter in širokega črevesa pri ljudeh (Imai in Nakagawa, 2003), (3) plazemska GPX ali GPX3 je ekstracelularni encim, ki kot donorje elektronov poleg GSH uporablja tudi tioreduksinski in glutaredoksinški sistem (Björnstedt in sod., 1994), precej je v ledvicah (Mates in sod., 1999) in (4) fosfolipid hidroperoksid GPX (GPX4 ali PH-GPX), ki se nahaja v mitohondrijih, citoplazmi in jedrni ter celični membrani. Slednja ima ključno vlogo pri zaščiti membrane pred lipidno peroksidacijo (Chu in sod., 1993; Cejas in sod., 2004), saj neposredno reducira hidroperokside fosfolipidov, maščobnih kislin in holesterola v peroksidiranih membranah in oksidiranih lipoproteinih (Mates in sod., 1999). Ta encim se pojavlja v monomerni obliki, ostale GPX pa v tetramerni (Imai in Nakagawa, 2003). Pri miših sta opisana še encima GPX5 in GPX6, ki se nahajata v nadmodku in vohalnem epiteliju (Chu in sod., 2004). Ti dve GPX sta imunološko različni in kodirani z različnimi geni (Jefferies in sod., 2003). Mitohondrijska PH-GPX je pomembna v kontroli apoptoze zaradi svoje aktivnosti pri redukciji peroksidiranega kardiolipina (Nomura in sod., 2000; Imai in Nakagawa, 2003) in se verjetno ravno zaradi svojega pomena počasneje odziva na pomanjkanje selena (Cejas in sod., 2004; Chu in sod., 2004). PH-GPX je zaradi zviševanja antioksidantne kapacitete celic zelo pomembna pri zaščiti pred ksenobiotiki, citostatiki in karcinogeni. Čeprav si GPX deli substrat ( $H_2O_2$ ) s katalazo, lahko sama zelo uspešno reagira z maščobnimi in drugimi organskimi hidroperoksidi in je tako glavni vir zaščite v stanju oksidativnega stresa (Mates in sod., 1999). Superoksidni radikal inhibira GPX1 (Sun, 1990).

### 2.3.3 Superoksidna dismutaza

Tako kot glutation peroksidaza, tudi superoksidna dismutaza predstavlja prvo linijo obrambe pred ROS. SOD znatno pospeši reakcijo dismutacije, v kateri pretvarja reaktiven  $O_2^{\bullet-}$  v manj reaktiven  $H_2O_2$ . Funkcijsko je sklopljena z GPX in CAT, ki katalizirata nadaljni razkroj  $H_2O_2$  (Gutteridge, 1994; Mates in sod., 1999; Mates in Sanchez-Jimenez, 2000). Superoksidni radikali dismutirajo pod vplivom mitohondrijske tetramerne SOD, ki v svojem aktivnem mestu vsebuje mangan (Mn-SOD), citosolne dimerne SOD, ki vsebuje Cu in Zn (CuZn-SOD) ter se nahaja tudi v intermembranskem prostoru mitohondrijev (Sato in sod., 2003), in ekstracelularne tetramerne SOD (EC-SOD) (Sun, 1990; Imai in Nakagawa, 2003). Slednja je glikoprotein s Cu in Zn v aktivnem mestu (Mates in sod., 1999), ki se sintetizira v citosolu in

nato prehaja v ekstracelularni prostor, kjer se s heparin-veznimi domenami veže na proteine matriksa ekstracelularnega prostora (Kinnula in Crapo, 2004). Celični SOD ne prehajata celičnih membran (Mates in Sanchez-Jimenez, 2000). CuZn-SOD inhibira nastanek OH (Ray in Husain, 2002). Indukcijo Mn-SOD v tkivih sesalcev primarno koordinirajo citokini, zmerno pa tudi oksidanti. Tumor nekrotizirajoči faktor (TNF) selektivno inducira Mn-SOD v različnih mišjih tkivih, ekspresija humanih genov za Mn-SOD v transgenih miškah pa omogoča zaščito pred kardiotoksičnostjo doksorubicina in s kisikom povzročenih poškodb pljuč (Mates in sod., 1999). Popolna odstranitev gena za Mn-SOD vodi v perinatalno smrt, heterozigotne miške z znižano aktivnostjo Mn-SOD pa so bolj podvržene mitohondrijskim oksidativnim poškodbam. Miške brez gena za CuZn-SOD preživijo, vendar se njihove celice delijo počasneje. Preživetje miši brez gena za EC-SOD je krajše, ob izpostavitvi oksidativnemu stresu pa pride do močnejše izraženih poškodb pljučnega tkiva. Večje količine Mn-SOD se nahajajo v srcu, možganih, jetrih in ledvicah, CuZn-SOD v jetrih, ledvicah, eritrocitih in centralnem živčnem sistemu, EC-SOD pa v ožilju, pljučih, maternici in ščitnici (Kinnula in Crapo, 2004).

### **2.3.4 Celokupna antioksidantna kapaciteta**

Celokupna antioksidantna kapaciteta (angl. TAC-Total Antioksidant Capacity) zajema skupno delovanje vseh antioksidantov v plazmi in telesnih tekočinah in predstavlja integriran parameter in ne le vsote vseh merljivih antioksidantov (Ghiselli in sod., 2000) kot so urati, askorbinska kislina, bilirubin, proteinske sulfhidrilne (SH) skupine, koencim Q<sub>10</sub> in  $\alpha$ -tokoferol (Aejmelaeus in sod., 1997). Izčrpavanje TAC, ki nastaja kot posledica oksidativnega stresa, se prekine s pričetkom sproščanja antioksidantov, ki so nakopičeni predvsem v jetrih in maščobnem tkivu ter z indukcijo ali aktivacijo antioksidantnih encimov (Pspotová in sod., 2001). V kasnejši fazi oksidativnega stresa vsebnost TAC pade zaradi znižanja količine antioksidantov. Na TAC lahko bistveno vpliva tudi prehrana, pri čemer je vrh TAC 1-2 uri po zaužitju obroka, njena raven pa se zniža v naslednjih 4-5 urah. Nekatere raziskave so dokazale vpliv dlje trajajoče diete na zvišanje plazemskega TAC, spet druge ne (Serafini in Del Rio, 2004).

Poznamo več različnih metod določanja TAC, ki se lahko razlikujejo glede na nastanek prostih radikalov, glede na oksidant in tarčo ter glede na fiziološko ustreznost (Cao in Prior, 1998). Metode, ki se trenutno najbolj uporabljajo so: FRAP (angl. FRAP-Ferric Reducing

Antioxidant Potential), TRAP (angl. TRAP-Total Radical-trapping Antioksidant Parameters), ORAC (angl. ORAC-Oxygen Radical Absorbance Capacity) in TEAC (TEAC-Trolox equivalent antioxidant capacity) (Cao in Prior, 1998; Serafini in Del Rio, 2004).

Železoreducirajoč antioksidantni potencial (angl. **FRAP** – Ferric Reducing Antioxidant Potential) meri sposobnost plazme, da reducira brezbarven železov-tripiridiltriazinski kompleks (TPTZ-Fe<sup>3+</sup>) v obarvano obliko (TPTZ-Fe<sup>2+</sup>). Gre za spektrofotometrično metodo, ki ne meri v maščobah topnih antioksidantov in tiolnih skupin (Benzie in Strain, 1996).

Skupna kapaciteta antioksidantov lovilcev radikalov (angl. **TRAP** – Total Radical-trapping Antioxidant Parameters) meri sposobnost antioksidantov, da odstranijo peroksilne radikale. TRAP ni primeren za neposredno merjenje v maščobi topnih antioksidantov.

Kapaciteta absorbance kisikovega radikala (angl. **ORAC** – Oxygen Radical Absorbance Capacity) temelji na istem kemičnem principu kot TRAP, vendar tu dobimo podatek o deležu in trajanju inhibicije delovanja prostih radikalov (Cao in Prior, 1998). Glavna slabost te metode je, da plazemske beljakovine precej prispevajo k plazemski TAC, kar vodi v podcenitev dejanskih antioksidantnih lovilcev (Serafini in Del Rio, 2004). Z različnimi ekstrakcijskimi tehnikami je možno proteine odstraniti in tudi v grobem ločiti ali gre za vodotopne ali v maščobah topne antioksidante (Cao in Prior, 1998).

Troloksu ekvivalentna antioksidantna kapaciteta (**TEAC** – Trolox equivalent antioxidant capacity) temelji na tvorbi ferilmioglobinskega radikala (iz reakcije metmioglobina s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ki nato reagira z ABTS in tvori ABTS<sup>•+</sup> kation. Plazemski oziroma serumski antioksidanti inhibirajo kopičenje ABTS<sup>•+</sup> proporcionalno s TAC, kar merimo spektrofotometrično, s padcem absorbance. Problem te metode so nefiziološki pogoji reakcije (Serafini in Del Rio, 2004) in dejstvo, da inhibicijo kopičenja ABTS<sup>•+</sup> določamo v nekem fiksnem času, ne da bi upoštevali čas trajanja inhibicije (Cao in Prior, 1998). Metoda določanja celokupne antioksidantne kapacitete, ki zajema antioksidante topne v maščobah (TACBF v naši raziskavi), je novejša izvedba TEAC metode, ki temelji na kemiluminiscenčnem merjenju. Metoda omogoča ločeno določanje TAC, ki zajema le lipofilne oziroma le vodotopne antioksidante.

Pričakovali bi, da bodo različne metode dale primerljive rezultate. Ker pa ti vedno ne korelirajo med seboj, bi morali za verodostojnejšo oceno TAC zbrati rezultate posameznih metod in jih med seboj celostno primerjati (Serafini in Del Rio, 2004).

## 2.4 Oksidativni stres in antioksidanti pri atopičnem dermatitisu

Koža je zaradi svoje vloge bariere nenehno izpostavljena oksidativnemu stresu, ki ga povzročajo ROS. Le ti neprestano nastajajo tako iz endogenih kot tudi iz eksogenih virov v celicah epidermalnih keratinocitov (Brigant in Picardo 2003; Portugal in sod., 2007). Endogeni ROS nastajajo kot del normalnega celičnega metabolizma v mitohondrijih pri delu dihalne verige elektronskega transporta, pri imunskem odgovoru in kot del različnih patoloških procesov (Portugal in sod., 2007). Vir eksogenih ROS pa predstavljajo onesnaževalci atmosfere, UV sevanje, mikroorganizmi, virusi ter ksenobiotiki (Trouba in sod., 2002). Dokazano je, da povečana tvorba ROS in motnje v ravnotežju med oksidanti in antioksidanti (redoks status) vodijo v oksidativni stres in s tem izzvano tvorbo številnih imunskih in vnetnih molekul, kar vodi v vnetne procese in poškodbo tkiva (Mates in sod., 2000). Oksidativni stres prispeva k razvoju pojavov na koži, kot so rdečina, oteklina, vnetje, preobčutljivost in rak (Portugal in sod., 2007). Za zoperstavljanje škodljivim učinkom oksidativnega stresa je koža sesalcev opremljena z mehanizmi antioksidantne zaščite. Ti mehanizmi preprečujejo oksidativne poškodbe strukturnih lipidov in proteinov ter tako pripomorejo k celovitosti bariere, ki je pglavitnega pomena za zdravje kože. Antioksidantna zaščita kože je sestavljena iz encimskih in neencimskih antioksidantov. Encimski antioksidanti v koži so GPX, CAT in SOD. Neencimski antioksidantni lovilci v koži pa so  $\alpha$ -tokoferol, vitamin C, glutation,  $\beta$ -karoten in koencim Q<sub>10</sub> (Richelle in sod., 2006). Alfa-tokoferol in  $\beta$ -karoten se kopičita v celičnih membranah in tako zagotavljata zaščito pred lipidno peroksidacijo. Rezultat povečane lipidne peroksidacije je sprožanje imunskih in vnetnih reakcij (Briganti in Picardo 2003; Javanbakht in sod., 2010).

Številne raziskave so potrdile pomembno vlogo oksidativnega stresa v patogenezi atopičnega dermatitisa pri ljudeh (Tsuboi in sod., 1998; Omata in sod., 2001; Antille in sod., 2002; Niwa in sod., 2003; Nakai in sod., 2009). V procesu vnetja kože pri atopičnem dermatitisu so vključeni mastociti in T limfociti. Z IgE-posredovana aktivacija mastocitov vodi v sproščanje različnih kemičnih mediatorjev kot so histamin, prostaglandini, bradikinin, trombocite-stimulirajoči faktorji in levkotrieni, ki povzročijo infiltracijo limfocitov, monocitov in eozinofilnih granulocitov v prizadete dele kože. Te celice sproščajo vnetne citokine (IL-4, IL-5) in ROS (vodikov peroksid, superoksidni radikal, singletni kisik in peroksinitrit) zaradi imunološke in neimunološke stimulacije. Dokazano je, da IL-4 lahko v veliki meri preklaplja signale na B celicah in tako stimulirajo sintezo IgE, IL-5 pa vzpodbujajo IL-4-

odvisno IgE sintezo (Matsuda in sod., 1997). Vodikov peroksid stimulira sproščanje histamina (Mates in sod., 2000). Keratinociti in mikrovaskularne endotelijske celice lahko vplivajo na vnetni odziv pri atopičnem dermatitisu z sproščanjem citokinov, vezavo molekul in kemotaktičnih faktorjev. Poleg tega so polimorfonuklearni levkociti v cirkulaciji bolnikov z atopičnim dermatitisom hiperaktivni in kažejo povečano sproščanje ROS celo v fazi mirovanja. Povečano aktivnost polimorfonuklearnih levkocitov povezujejo s povečanim sproščanjem citokinov v prizadetih delih kože (Omata in sod., 2001; Briganti in Picardo, 2003). Spiteri in sodelavci (2000) menijo, da epiteljske celice bolnikov z atopičnim dermatitisom niso več sposobne metabolizirati ROS preko encimskega in neencimskega sistema, kar vodi do oksidativnega stresa. Ugotovili so, da se posamezniki lahko razlikujejo v sposobnosti detoksikacije oksidantov, bodisi zaradi genetskih faktorjev ali zaradi izpostavljenosti različnim drugim faktorjem iz okolja, ki povečujejo oksidativni stres. Boljše detoksifikacijske sposobnosti so posameznikom omogočale lažje obvladovanje atopičnega vnetja. Domnevajo, da slabša sposobnost detoksifikacije pri bolnikih z atopičnim dermatitisom vodi v sproščanje kemotaktičnih faktorjev, aktivacijo in okrepitev imunskih efektorskih celic, podaljšanje vnetja in stimulacijo mehanizmov bronhokonstrikcije. Zdi se torej, da te spremembe tvorijo začaran krog, ki vodi do nadaljnih imunskih aktivacij, oksidativnih poškodb in s tem širjenja kožnega vnetja (Briganti in Picardo 2003).

Menijo, da je nastanek atopičnega dermatitisa povezan tudi z moteno homeostazo kisikovih in dušikovih radikalov zaradi povečanega oksidativnega stresa, kar se kaže v povečani ekskreciji 8-hidroksi-2-deoksigvanozina v urinu (Omata in sod., 2001; Briganti in Picardo, 2003). Konstitutivna endotelijska sintaza dušikovega oksida (NOS) je pro-oksidativni encim, ki se nahaja v vaskularnem endoteliju dermisa in katalizira reakcijo nastanka dušikovega oksida (NO) (Rowe in sod., 1997; Fuchs in sod., 2001). Njeno sintezo pospešujejo infiltrirani levkociti in druge fagocitne celice (Bickers in Athar, 2006). Vir NO so keratinociti, Langerhansove celice, fibroblasti in endotelijske celice. Dušikov oksid igra pomembno vlogo kot vazodilatatorna komponenta vnetnega odgovora in kot modulator imunskega odgovora kože (Fuchs in sod., 2001). Predvidevajo, da NO stimulira sintezo T-limfocitov in s tem vpliva na povečano izločanje citokinov, ki vplivajo na spremembe v koži (Rowe in sod., 1997).

V humani medicini je znano, da dodajanje antioksidatov v hrano preprečuje oksidativni stres in s tem zmanjšuje vnetni odgovor ter na ta način pomaga organizmu, da omeji vnetni odgovor in s tem alergijsko bolezen (Hughes, 2001; Devereux in Seaton, 2005).

Najpomembnejši antioksidanti so vitamin E, C, ter  $\beta$ -karoten in selen (Oh in sod., 2010). Nedavne raziskave pri ljudeh so pokazale, da je vitamin E lahko varna in učinkovita podporna terapija atopičnega dermatitisa (Tsourelis-Nikita in sod., 2002; Javanbakht in sod., 2011).

Zaradi velike vsebnosti lipidov v koži lahko lipofilni neencimski antioksidant, kot je vitamin E, štiti kožo pred oksidativnim stresom. Raziskave pri ljudeh so pokazale, da imajo bolniki z atopičnim dermatitisom tudi do dvakrat višje vrednosti vitamina E v koži kot zdravi in s tem nižjo koncentracijo lipidnih peroksidov, kot rezultat prilagojenega odziva na kronično vnetje (Antille in sod., 2002; Briganti in Picardo, 2003). Raziskave so pokazale, da dodatek vitamina E k že uveljavljeni terapiji zniža serumske vrednosti IgE in pripomore k hitrejši remisiji atopičnega dermatitisa (Tsourelis-Nikita in sod., 2002). Javanbakht in sodelavci (2011) so dokazali signifikantno negativno povezavo med serumsko koncentracijo vitamina E in vrednostjo SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis - metoda validacije obsega in stopnje ekcema pri bolnikih z atopičnim dermatitisom) pri ljudeh, ki so bili zdravljeni z vitaminom E. Vitamin E lahko vsaj preko dveh mehanizmov poveča imunski odziv pri ljudeh z atopičnim dermatitisom. Kot močan antioksidant štiti celične membrane makrofagov pred oksidativnimi poškodbami (Tsourelis-Nikita in sod., 2002). Njegova neantioksidantna vloga pa je povezana s T celicami pomagalkami ( $T_H$ ). Te celice igrajo poglavitno vlogo pri inicijaciji in ohranjanju kroničnega vnetnega procesa pri astmi in atopičnem dermatitisu. Ugotovljeno je, da vitamin E sodeluje pri pospeševanju diferenciacije celic pomagalk ( $T_H$ ) s pospeševanjem sekrecije citokinov iz  $T_H1$ , ter z inhibicijo sekrecije citokinov iz  $T_H2$ , kar se kaže v zmanjšani sekreciji IL-4 ter posledično v zmanjšani proliferaciji limfocitov B in zmanjšani diferenciaciji v plazmatke, ter zmanjšani tvorbi protiteles tipa IgE (Devereux in Seaton, 2005). Pred nedavnim so dokazali, da je znižanje nivoja IgE pomembno povezano z znižanjem stopnje alergijske preobčutljivosti pri ljudeh z atopičnim dermatitisom (Fogarty in sod., 2000; Tsourelis-Nikita in sod., 2002).

O antioksidantnem statusu pri psih z atopičnim dermatitisom v literaturi ni podatkov. Namen našega dela je bil določiti parametre antioksidantnega statusa psov z atopičnim dermatitisom, ki smo ga primerjali z antioksidantnim statusom zdravih psov. V drugem delu raziskave smo zdravili skupino atopičnih psov z antihistaminiki z ali brez dodatka vitamina E in tako ugotavljali, ali dodatek vitamina E vpliva na uspešnost zdravljenja atopičnega dermatitisa psov. Ugotavljali smo torej, ali je antioksidantni status pri psih z atopičnim dermatitisom porušen in ali je podporna terapija z vitaminom E smiselna.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Živali

V obdobju treh let smo izvedli randomizirano dvojno slepo raziskavo. Vključili smo 29 psov z diagnozo atopičnega dermatitisa in 17 zdravih psov, starih od 1 do 5 let, različnih pasem in obeh spolov. Lastniki psov so ob vključitvi v raziskavo podpisali pisno privolitev za sodelovanje. Vsi postopki so potekali v skladu z veljavnimi slovenskimi državnimi predpisi (Zakon o zaščiti živali UL RS, 43/2007) in so bili potrjeni s strani Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava Republike Slovenije; dovoljenje št. 34401-85/2008/11.

#### 3.2 Vključitveni in izključitveni kriteriji

Psi z diagnozo atopični dermatitis, ki so bili vključeni v raziskavo, so morali zadostiti naslednjim pogojem.

Predhodno smo s kliničnim pregledom psov in opravljenimi krvnimi preiskavami izključili bolezni, pri katerih je oksidativni stres dokazano vpleten v njihovo patogenezo (rakava obolenja, sladkorna bolezen, obolenja srca, ledvic in jeter) ter kožne bolezni, ki jih je potrebno izključiti pred potrditvijo diagnoze atopični dermatitis (parazitarne kožne bolezni ter druge alergijske bolezni). Zaradi zanesljive izključitve garjavosti (invadiranosti s *Sarcoptes scabiei* var. *Canis*) so bili psi v obdobju dveh mesecev pred vključitvijo tretirani s Stronghold-om (Pfizer, Ramsgate Road, Sandwich, Kent) ali ivermektinom. Psi so morali biti prosti bolh in so bili zato v času študije zaščiteni z dolgo delujočim antiparazitikom (Frontline combo Merial, Lyon, Francija). Dovoljeni so bili antiseboroični, keratolitični ali antiseptični šamponi in ušesna čistila, če so bila ta zdravila redno uporabljena vsaj 3 tedne pred vključitvijo in med raziskavo lastnik ni spreminjal režima njihove uporabe. Psi so 3 mesece pred vključitvijo v študijo prejeli individualno prilagojeno, doma pripravljeno eliminacijsko dieto, ki smo jo zadnji mesec pred vključitvijo nadomestili s študijsko dieto. Pogoj za vključitev psa v študijo je bila ocena CADESI-03 (Olivry in sod., 2007), ki je ob vključitvi znašala minimalno 25 točk, klinična diagnoza atopičnega dermatitisa pa je bila postavljena na osnovi ocene major in minor kriterijev po Willemse-ju (Willemse, 1986). Upoštevali smo vsaj 3 major kriterije in 2 minor kriterija.

Minor kriteriji so naslednji:

1. pozitivni intradermalni testi;
2. pojav prvih simptomov med 6. meseci in 3. leti starosti;
3. bilateralni konjunktivitis;
4. površinsko gnojno vnetje kože;
5. eritem obraza in hiperhidroza.

V študijo nismo vključili psov oziroma so bili med študijo izključeni psi:

1. s prisotnimi ektoparaziti;
2. s simptomi alergije na boljši pik;
3. pri katerih alergija na hrano ni bila izključena ali ni bila kontrolirana z ustrezno dieto;
4. s prisotno simptomatsko bakterijsko ali glivično okužbo kože;
5. ki so bili zdravljeni s prostaglandini v zadnjem tednu dni;
6. ki so bili zdravljeni z antihistaminiki v zadnjih 2 tednih;
7. ki so bili zdravljeni z oralnimi ali topikalnimi glukokortikoidi ali ciklosporini v zadnjih 4 tednih;
8. ki so bili zdravljeni z depo injekcijskimi glukokortikoidi v zadnjih 8 tednih;
9. ki so prejeli nadomestke esencialnih maščobnih kislin v zadnjih 12 tednih;
10. ki so prejeli nadomestke vitamina E v zadnjih 12 tednih;
11. ki so bili zdravljeni po postopku imunoterapije v zadnjih 12 mesecih;
12. s prisotnostjo znakov gonitve, predvidene ali slučajne brejosti psic v času študije;
13. z zdravstvenim stanjem, ki po dosedanjem vedenju lahko vpliva na oksidativni status;
14. kadar lastnik psa ni želel sodelovati v raziskavi.

Zdrave pse smo vključili na podlagi kliničnega pregleda, opravljenih krvnih preiskav in podpisane privolitve lastnika, da sodeluje v raziskavi.

### **3.3 Cadesi-03 sistem kliničnega vrednotenja**

Kožne spremembe ob vključitvi v raziskavo in vplive zdravljenja na kožo smo klinično vrednotili s **CADESI-03** (Olivry in sod., 2007) sistemom točkovanja. Izraz izhaja iz stavka "Canine Atopic Dermatitis Extent Severity Index". Ocenjevali smo prisotnost in intenziteto rdečine kože, lihenifikacije, ekskoriacije in neodlakanosti na 62 delih telesa. Vsak parameter je bil ocenjen z oceno od 0 do 5 (0 = ni sprememb, 1 = blaga sprememba, 2 ali 3 = srednje

močna sprememba, 4 ali 5 = zelo močna sprememba), v primerjavi s fotolestvico, ki smo jo izdelali na podlagi fotografij različnih kliničnih primerov (fotolestvica v prilogi). Meritev smo opravili ob vsakem obisku. Maksimalno število doseženih točk ob vsakem obisku je bilo lahko 1240. S seštevkom točk z vseh delov telesa smo dobili vsoto, ki je bila statistično vrednotena.

Lastnikom psov smo ob prvem obisku predstavili in obrazložili numerično skalo za oceno srbeža. Prosili smo jih, da se ob vsakem obisku opredelijo o aktualni oceni srbeža pri njihovem psu. Lastnikom smo vročili pisna navodila za ocenjevanje, s pomočjo katerih so v obdobju 14 dni do naslednjega obiska usmerjeno opazovali svojega psa. Ob vsakem obisku so torej lastniki psov podali oceno srbeža za preteklo obdobje med dvema obiski pri nas.

Za oceno srbeža na numerični skali je lastnik podal svoja opažanja z oceno od 0 do 5 (0 = brez srbeža, 1 = blag srbež, 2 = blag do zmeren srbež, 3 = zmeren srbež, 4 = zmeren do hud srbež, 5 = hud srbež) (Numerična skala za oceno srbeža v prilogi).

### 3.4 Dieta

Psi s potrjeno diagnozo atopični dermatitis so za izključitev netolerance oziroma alergije na hrano tri mesece pred vključitvijo v raziskavo prejeli individualno sestavljeno, doma pripravljeno eliminacijsko dieto. Zaradi poenotenja vnosa vitamina E smo psom 1 mesec pred vključitvijo in ves čas raziskave odredili raziskovalno dieto, ki je temeljila na enotedenskem uživanju konjskega mesa in prosene kaše ter enotedenskem uživanju osliča in ovsenih kosmičev, izmenično. Raziskovalna dieta je po podatkih analize (Salobir in sod., 2010), ki so jo opravili na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani vsebovala  $9,02 \pm 0,46$  (povprečna vrednost  $\pm$  standardna deviacija) mg  $\alpha$ -tokoferola/kg živila. Skupina zdravih psov (kontrolne živali) je v skladu z anamnezo prejela podobno količino  $\alpha$ -tokoferola na kilogram zaužitega živila (Harris in sod., 1950; Souci in sod., 2008).

### 3.5 Uporabljena zdravila

Pse z atopičnim dermatitisom smo dvojno slepo razdelili v 2 skupini. Prva skupina (skupina vitamin E) (14 psov) je prejela antihistaminik *feksofenadin* s peroralno aplikacijo v odmerku 18 mg/kg t.m. enkrat dnevno z dajanjem zdravila Telfast® (Aventis pharma Deutschland GmbH, Frankfurt, Nemčija), ter antioksidant vitamin E v priporočenem odmerku 8,1 IE/kg t.m. enkrat dnevno (Stein, 2000) v obliki prehrabnega dodatka (olje E-OIL, Natural Wealth). Druga skupina (skupina placebo) (15 psov) je poleg *feksofenadina*, v

enakem odmerku kot prva skupina, prejela placebo v obliki mineralnega olja. Vitamin E oziroma mineralno olje sta bila pakirana v enaki embalaži in označena z zakodirano številko, odmerki pa so bili enaki, tako da tako raziskovalci kot lastniki psov niso vedeli, katero zdravilo prejema določena žival. Psi so prejeli zdravila v obdobju 8 tednov.

### **3.6 Postopek po vključitvi živali v študijo**

V obdobju 8 tednov smo petkrat (dan vključitve, 2. , 4. , 6. in 8. teden zdravljenja) ocenjevali klinične spremembe na koži psov s pomočjo CADESI-03 sistema točkovanja. Lastniki so s pomočjo vizualne analogne skale ocenjevali stopnjo srbeža. Ob vsakem obisku smo psom iz vene jugularis odvzeli vzorce krvi za določanje:

-hematoloških parametrov: krvna slika in diferencialna bela krvna slika;

-biokemijskih parametrov: sečnina, kreatinin, alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AF), holesterol in trigliceridi;

-antioksidantnih parametrov: celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC), glutation peroksidaza (GPX) in superoksidna dismutaza (SOD);

-plazemske koncentracije produkta lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA);

- plazemske koncentracije vitamina E.

Ob vsakem obisku smo odvzeli ostružke spremenjenih delov kože in preparate pregledali parazitološko.

Ob prvem obisku (dan vključitve) in zadnjem obisku (8. teden zdravljenja) smo odvzeli tudi vzorce kože za določanje koncentracije vitamina E v njih.

### **3.7 Priprava krvnih in kožnih vzorcev**

Kri za hematološke preiskave smo odvzeli v 0,5 ml epruvete z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA (BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA).

Za pripravo seruma za biokemijske preiskave smo kri odvzeli v 4 ml-epruvete z aktivatorjem koagulacije in separacijskim gelom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Vzorce krvi smo v roku pol ure po odvzemu (po končani koagulaciji) centrifugirali 10 minut pri 1300×g pri 4 °C ter odločili serum.

Kri za določanje koncentracije vitamina E, celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS (Total Antioxidant Status, RANDOX, Crumlin, Velika Britanija) in določanje celokupne antioksidantne kapacitete, ki temelji na maščobah topnih antioksidantih, z reagenčnim kompletom PHOTOCHEM<sup>®</sup> (Analytik Jena, Jena, Nemčija) smo odvzeli v 2x2 ml epruvete z antikoagulantom litijevim-heparinom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Vzorce krvi smo v času do pol ure po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500×g pri 4 °C. Po centrifugiranju smo dobljeno plazmo iz vsake epruvete razdelili na dva dela ter vzorce plazme do analize zamrznili pri -80 °C.

Kri za določanje aktivnosti GPX v hemolizatu polne krvi smo odvzeli v 2 ml-epruvete z antikoagulantom litijevim-heparinom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Po 200 µL polne heparinske krvi smo odpipetirali v paralelkah v epruvetke za zamrzovanje in vzorce do analize zamrznili pri -80 °C.

Kri za določanje SOD v hemolizatu eritrocitov smo odvzeli v 2 ml-epruvete z antikoagulantom litijevim-heparinom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Hemolizat eritrocitov smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca reagenčnega kompleta RANSOD (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija), katerega smo uporabili za določanje aktivnosti SOD. 500 µL polne heparinske krvi smo odpipetirali v dve centrifugirki (delali smo v paralelkah) in vzorec centrifugirali 10 minut pri 1300×g pri 4 °C. Po centrifugiranju smo plazmo zavrgli, sediment krvnih celic pa 4x spirali s 3 ml fiziološke raztopine (0,9% natrijev klorid; BRAUN, Melsungen, Nemčija) ohlajene pri 4 °C. Vzorce smo po vsakem dodatku fiziološke raztopine rahlo premešali in centrifugirali 10 minut pri 1300×g pri 4 °C. Po četrtem centrifugiranju smo sedimentu celic dodali 2 ml redestilirane vode (Aqua redestilata, Pliva, Zagreb, Hrvaška) ohlajene pri 4 °C ter 15 minut inkubirali v hladilniku pri 4 °C. Po 15 minutah smo centrifugirki dobro premešali in hemolizatu določili koncentracijo hemoglobin s ciano-methemoglobinsko metodo na avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Tako pripravljene vzorce hemolizata eritrocitov smo razdelili v dve v epruvetki za zamrzovanje in jih do analize shranili pri -80 °C.

Kri za določanje plazemske koncentracije malondialdehida smo odvzeli v 2ml-epruvete z antikoagulantom litijevim-heparinom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija), in jo takoj po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500×g na 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo plazmo ločili in takoj zamrznili na -80 °C do analize.

Pred odvzemom vzorcev kože smo pse pomirili z hidroklorid medetomidinom (Domitor<sup>®</sup>, Pfizer animal health, New York, ZDA) z uporabo odmerkov, ki jih priporoča proizvajalec. Za lokalno anestezijo smo uporabili 2% lidokain (Xylocaine<sup>®</sup>, Astra Zeneca UK Limited) v

odmerku 1 ml na 5 kg telesne teže. Pet do deset minut po injiciranju lokalnega anestetika, smo vzorce kože odvzeli po postopku luknjičave biopsije kože s krožnim rezilom premera 8 mm (Kruuse, Langeskov, Danska). Od tri do pet vzorcev prizadete kot tudi zdrave kože smo jemali na področju prsnice in trebuha. Odvzetim vzorcem kože smo s pomočjo skalpela odstranili maščobno tkivo. Vzorce odvzete kože smo takoj po odvzemu shranili v tekočem dušiku in nato v zmrzovalniku pri -80 °C do analize.

Hematološke in biokemijske preiskave ter določanje aktivnosti GPX, SOD in vrednosti celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS smo opravili v diagnostičnem laboratoriju Klinike za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Določanje celokupne kapacitete, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah, ter koncentracijo MDA in vitamina E v plazmi, smo opravili v kemijskem laboratoriju Katedre za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehnične fakultete Univerze v Ljubljani. Koncentracijo vitamina E v koži smo opravili v laboratoriju Inštituta za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

### **3.8 Hematološke preiskave**

Krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko smo določali z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem ADVIA 120 (SIEMENS, Nemčija). Hematološke preiskave so zajemale določitev naslednjih parametrov: število eritrocitov, trombocitov ter levkocitov (relativno in absolutno), število nevtrofilcev, limfocitov, monocitov, eozinofilcev, patološke celice (LUC - Large Unstained Cells), hematokrit in koncentracija hemoglobina (Hgb), povprečen volumen eritrocitov, povprečna količina hemoglobina v eritrocitih, povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih.

### **3.9 Biokemijske preiskave**

Vse biokemijske parametre smo določali z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija).

### **3.10 Določanje celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom TAS (TAC)**

TAC smo določali spektrofotometrično (600 nm) z reagenčnim kompletom TAS na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Metoda določanja je posredna, saj v reakciji nastale proste radikale (ABTS<sup>•+</sup>-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) reducirajo v vzorcu prisotni antioksidanti, kar merimo z znižanjem absorbance pri 600 nm po treh minutah. Rezultate smo izrazili kot mmol/l Trolox ekvivalentov (standard, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina – derivat vitamina E).

### **3.11 Določanje celokupne antioksidantne kapacitete z reagenčnim kompletom PHOTOCHEM (TACBF)**

Metoda določanja celokupne antioksidantne kapacitete, ki zajema antioksidante topne v maščobah, temelji na kemiluminiscenčnem merjenju z aparaturo PHOTOCHEM (Analytik Jena, Jena, Nemčija). Vzorce plazme, smo najprej odtalili, ter jih nato premešali z vrtinčnikom (vorteks). V 1,5 ml plastično posodico s pokrovčkom smo odpipetirali 100 µl metanola in 100 µl plazme. Vzorce smo nato v vrtinčniku stresali 10 minut in jih nato centrifugirali pri 25 000 rpm 10 minut pri 4 °C. Vzorce smo do analize hranili v temnem hladnem prostoru nad ledom. Antioksidantno kapaciteto, ki zajema antioksidante, topne v maščobah, smo v vzorcih plazme določali na pretočni merilni celici PHOTOCHEM<sup>®</sup> (Analytik Jena, Jena, Nemčija).

### **3.12 Določanje aktivnosti glutathion peroksidaze**

Aktivnost GPX v hemolizatu polne krvi smo določali spektrofotometrično (340 nm) z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Uporabili smo komercialno dostopen reagenčni komplet RANSEL (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija), katerega osnova je posredna metoda določanja aktivnosti GPX (Paglia in Valentine, 1967). GPX katalizira oksidacijo GSH s sintetičnim kumen hidroperoksidom; pri reakciji nastali GSSG se nato v indikatorski reakciji z GR in ob prisotnosti NADPH prevede v GSH in NADP. Hitrost oksidacije NADPH, ki jo merimo kot padec absorbance pri 340 nm, je proporcionalna aktivnosti GPX v vzorcu. Aktivnost GPX smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb).

### **3.13 Določanje aktivnosti superoksidne dismutaze**

Aktivnost SOD v hemolizatu eritrocitov smo določali spektrofotometrično pri 550 nm z reagenčnim kompletom RANSOD (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija) na avtomatskem biokemijskem analizatorju RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). V uporabljeni metodi je sistem za proizvodnjo superoksidnih radikalov pripravljen iz ksantina in ksantin oksidaze. Indikatorska spojina je 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolijev klorid (INT), ki reagira s superoksidnim radikalom v barvilo formazan. Aktivnost SOD smo merili s stopnjo inhibicije te reakcije. Iz umeritvene krivulje odstotka inhibicije standardnih raztopin in desetiškim logaritmom koncentracije (U/ml) smo določili aktivnosti SOD v neznanih vzorcih. Aktivnost SOD smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hgb).

### **3.14 Določanje koncentracije MDA v plazmi**

Koncentracijo MDA smo določali po analitičnem postopku, opisanem v literaturi (Rezar in sod., 2010). MDA smo v vzorcih derivatizirali s tiobarbituratno kislino (TBA) v kislem mediju (0,44 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Reakcijsko zmes smo segrevali 60 min pri 95 °C, nato smo jo ohladili na sobno temperaturo in filtrirali skozi 0,22 µm filter na avtomatski vzorčevalec vial. MDA-TBA<sub>2</sub> adukt je bil ločen z uporabo HPLC (Waters Alliance ločitveni modul), opremljen s Phenomenex HyperClone kromatografsko kolono ODS (5 mm, 4,6 mm id, 150 mm) in fluorescenčnim detektorjem Waters 474 (Waters, Milford, MA, ZDA). Instrument je bil umerjen z tetraetoksipropanom (TEP) kot zunanjim standardom (Rezar in sod., 2010).

### **3.15 Določanje koncentracije vitamina E v plazmi**

Koncentracijo vitamina E v plazmi smo določali po že opisanem postopku (Salobir in sod., 2010) z manjšo modifikacijo. Za ločevanje izomer vitamina E smo namesto kromatografske kolone Phenomenex, Prodigy ODS2 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm) uporabili kromatografsko kolono Luna PFP (Phenomenex, 5 mm, 4,6 mm id, 250 mm dolžine), ki omogoča ločevanje vseh štirih izomer (alfa, beta, gama in delta) tokoferolov. Mobilna faza je bila sestavljena iz metanola in vode v razmerju 95:5, pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1,2 ml / min. Priprava vzorcev (ekstrakcija vitamina E iz plazme), ostali kromatografski parametri (volumen injiciranega vzorca, detekcija – UV/VIS in fluorescenca) in obdelovanje kromatografskih podatkov so enaki, kot so opisani v referenci (Salobir in sod., 2010).

### 3.16 Določanje koncentracije vitamina E v koži

Koncentracijo vitamina E v vzorcih kože smo določali po analitičnem postopku, opisanem v literaturi (Rosa in sod., 2007;. Antille in sod., 2002.). Odmrznjene vzorce kože smo stehali (0,03 - 0,09 mg), in jih nato dali v steklene epruvete. Vsakemu vzorcu kože smo dodali, 0,25 mL raztopine butilhidroksitoluena (BHT) (2,5 g BHT (Merck, Darmstadt, Nemčija) smo razstopili v 50 ml metanola), 1,25 ml 2 M raztopine kalijevega hidroksida (KOH; 5,6 g KOH smo razstopili v 50 ml deionizirane vode) in 1,25 ml etanola. Vzorce smo nato kuhali v vodni kopeli pri 80 °C 30 minut. Po ohladitvi smo vzorce dvakrat ekstrahirali z 2 ml heksana. Heksan smo nato izparili v vakuumu (Syncore Reactor R-48, Büchi, Flawil, Švica) pri temperaturi okoli 60 °C do suhega. Suhe ostanke smo nato raztopili v 0,5 ml metanola.

Koncentracijo vitamina E smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC) s fluorescenčno detekcijo z uporabo zunanjega standarda alfa-tokoferola (Sigma, Saint Louis, MO, ZDA). HPLC sistem (Waters Alliance 2695, Waters, Milford, MA, ZDA) je bil opremljen s kolono  $\mu$  Bondapak C18, 10  $\mu$  m, 3,9 x 300 mm (Waters, Milford, MA, ZDA), fluorescenčnim detektorjem Waters 474 (Waters, Milford, MA, ZDA), ter računalnikom s programom za nadzor in obdelavo podatkov. Kot mobilno fazo smo uporabili metanol pri pretoku 2 ml min<sup>-1</sup>. Injekcijski volumen je bil 20  $\mu$ l. Kromatografija je bila izvedena pri sobni temperaturi, detekcija pa pri valovni dolžini vzbujanja 295 nm in valovni dolžini emisije 330 nm.

### **3.17 Statistična analiza**

Statistična analiza je vključevala obdelavo rezultatov skupin, ki so prejemale placebo in vitamin E, le te pa smo primerjali z rezultati skupine zdravih psov.

S Shapiro-Wilk testom smo ugotavljali normalnost porazdelitve dobljenih rezultatov znotraj vseh treh skupin. Za vse skupine smo izračunali povprečno in srednjo vrednost, standardno deviacijo (SD) in 95 % interval zaupanja po posameznih parametrih.

Statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami smo v primeru normalne porazdelitve primerjali s parametričnim Studentovim t-testom. Ko porazdelitev ni bila normalna, smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev test.

Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri  $p < 0,05$ .

Pri analizi podatkov smo uporabili osebni računalnik in statistični programski paket SPSS 12.0 for Windows.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Živali vključene v raziskavo

Tabela 1: 29 psov, vključenih v raziskavo, naključno razvrščenih v placebo in vitamin E skupino, ter 17 zdravih psov

	PACIENT (oznaka)	STAROST (meseči)	SPOL	PASMA	Tel. teža (kg)
<b>SKUPINA PLACEBO</b>	1	47	M	X	30
	2	25	Ž	LR	26,35
	3	54	Ž	GR	23,35
	4	60	Ž	GR	29
	5	42	Ž	KE	14
	6	41	M	DA	28,5
	9	30	Ž	STF	21
	13	50	Ž	FCR	35
	14	42	M	NO	40
	15	53	M	AD	46
	18	22	M	X	32
	19	30	Ž	NB	25,8
	27	46	M	X	27
	29	31	Ž	NB	31
<b>SKUPINA VITAMIN E</b>	7	49	M	LR	26,3
	8	57	Ž	DO	40
	10	56	M	GR	30
	11	14	M	ND	47
	12	34	M	KŠ	12,3
	16	28	Ž	BIG	17,5
	17	40	M	BC	27,4
	20	30	M	BT	21,5
	21	36	M	AST	39
	22	44	Ž	ŠBO	40
	23	38	M	LR	31
	24	17	Ž	SH	19,4
	25	16	Ž	FB	10
	26	57	M	WHT	10
28	13	Ž	LR	30	
<b>ZDRAVI</b>	1	51	Ž	LR	35
	2	47	M	X	12,3
	3	46	M	X	18
	4	60	M	X	28
	5	37	Ž	X	25,3
	6	20	Ž	DA	28
	7	60	Ž	NO	33
	8	35	Ž	X	10
	9	13	M	SO	10
	10	21	M	X	18

	<b>11</b>	13	Ž	GR	18
	<b>12</b>	26	M	ŠAR	60
	<b>13</b>	12	Ž	AT	20
	<b>14</b>	59	Ž	X	38,5
	<b>15</b>	12	Ž	X	21,4
	<b>16</b>	15	M	KE	25,3
	<b>17</b>	12	M	BT	10

LEGENDA: NO-nemški ovčar, WHT-beli višavski terier, NB-nemški bokser, X-mešanec, LR-labrador retriver, FB-francoski buldog, DA-dalmatinec, GR- zlati prinašalec, ND-nemška doga, KŠ- koker španjel, STF-staffordski bulterier, BIG-bigel, KE-avstralski čuvaj-kelpi, DO-doberman, AT-airedalski terier, ŠAR-šarplaninec, FCR- gladkodlaki prinašalec, AD- argentinska doga, BC- border collie, BT- angleški bulterier, AST- ameriški staffordski terier, ŠBO- švicarski beli ovčar, SH- sibirski husky, SO- shetlandski ovčar

Med raziskavo smo na željo lastnikov, ki niso več hoteli sodelovati v raziskavi (izključitveni kriterij številka 14) izključili 3 pse z atopičnim dermatitisom (številke 11, 14, 22), tako da je raziskavo zaključilo 26 psov. Statistično smo vrednotili rezultate psov, ki so raziskavo zaključili.

Kožni ostružki, narejeni ob vsakem obisku, so bili pri vseh psih negativni na *Demodex* in *Sarcoptes spp.*

Med raziskavo smo psoma številka 9 in 26 dodatno predpisali Clorexyderm oto<sup>®</sup> (ICF, Cremona, Italija) ušesno čistilo. Psom številka 20, 23, 25 in 26 smo med raziskavo dodatno predpisali zeliščni sprej ATOP7<sup>®</sup> (Dermoscent, Castres, Francija) za lokalno hlajenje srbeče kože. Lastnikom psov številka 7, 8, 15, 17, 20, 23, 24, 25, 26, 27 in 28 smo za blaženje lokalnih sprememb na koži priporočili uporabo mazila Bepanthen<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Nemčija).

Lastnica psa številka 27 je predpisano dieto namesto vsaki teden izmenjevala vsaki dan, kar pomeni, da je bil dnevni obrok razdeljen na jutranjega sestavljenega iz osliča in ovsene kaše, ter popoldanskega iz konjskega mesa in prosene kaše. Predpisana dieta pa je zapovedovala izmenjavanje enotedenskega obroka sestavljenega iz osliča in ovsene kaše ter enotedenskega obroka sestavljenega iz konjskega mesa in prosene kaše.

Lastnica psa številka 29 je ob začetku diete poročala o driski po zaužitih ribah, le ta pa je med raziskavo izzvenela.

#### **4.2. Vrednosti hematoloških in biokemijskih parametrov**

Vrednosti hematoloških in biokemijskih parametrov so bili pri vseh vključenih živalih pri vseh obiskih znotraj referenčnih vrednosti (Bush, 1998).

#### **4.3 Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži, srbeža ter CADESI-03 točkovanja med skupino placebo in skupino vitamin E pred pričetkom zdravljenja (obisk 1), med (obisk 2, 3, 4) in ob koncu zdravljenja (obisk 5)**

Kot je razvidno iz tabele 2, pred pričetkom zdravljenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama pri nobenem od merjenih parametrov. Nasprotno pa je primerjava med obema skupinama že ob drugem obisku (14. dan zdravljenja), kot tudi pri vseh naslednjih obiskih (3,4,5), pokazala statistično značilno višje vrednosti koncentracije vitamina E v plazmi, statistično značilno višje vrednosti *TACBF*, ki temelji na antioksidantih topnih v maščobah, ter statistično značilno nižje vrednosti CADESI-03 pri vitamin E skupini (Tabela 3, Slika 3).

Tabela 2: Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži, srbeža ter CADESI-03 točkovanja med skupinama placebo in vitamin E ob 1., 2., 3., 4. obisku ter ob koncu zdravljenja (5. obisk).

Obisk	Skupina	Parameter	VitE (nmol/ml)	TAC (mmol/l)	TACBF (nmol ekvivalentov trolox/ml)	GPX (U/g Hgb)	SOD (U/g Hgb)	MDA (nmol/ml)	VitE koža (µg/g kože)	Srbež	CADESI-03
1	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	30,79	1,07	84,45	435,70	2166,19	1,17	26,10	3,5	3,5
		Povprečna vrednost ± SD	29,07±9,14	1,08±0,07	83,84±17,52	443,68±71,34	2105,4±266,29	1,38±0,66	37,63±30,25	3,54±1,36	3,54±1,36
	Vitamin E (N=13)	Mediana vrednost	27,70	1,12	82,60	415,53	2074,02	1,69	23,30	3,5	3,5
		Povprečna vrednost ± SD	27,80±8,85	1,13±0,07	86,68±14,06	413,79±33,66	2130,21±282,24	1,58±0,48	29,22±20,93	3,92±1,42	3,92±1,42
	p		0,722	0,132	0,661	0,190	0,820	0,390	0,418	0,489	0,489
2	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	27,90	1,09	84,72	438,95	2183,64	1,31	/	2	23
		Povprečna vrednost ± SD	28,98±8,51	1,12±0,11	85,49±12,91	430,15±61,45	2118,31±255,61	1,37±0,82	/	2,38±1,12	28,46±16,20
	Vitamin E (N=13)	Mediana vrednost	60,20	1,17	100,70	401,90	2068,13	1,08	/	2	13
		Povprečna vrednost ± SD	63,47±29,67	1,2±0,11	103,65±22,99	404,07±37,81	2120,11±283,87	1,12±0,43	/	2,77±1,87	14,54±8,15
	p		<b>0,001</b>	0,083	<b>0,020</b>	0,205	0,987	0,343	/	0,533	<b>0,024</b>
3	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	25,50	1,13	92,74	404,52	2099,98	1,13	/	3	13
		Povprečna vrednost ± SD	26,82±7,92	1,14±0,08	91,08±15,71	416,84±61,86	2093,4±256,71	1,34±0,64	/	2,38±1,27	17,31±13,67
	Vitamin E	Mediana vrednost	59,61	1,25	107,60	402,17	2019,78	0,92	/	2	6

Plevnik Kapun A. Vpliv vitamina E na oksidativni stres pri psih z atopičnim dermatitisom

	(N=13)	Povprečna vrednost ± SD	71,65±38,71	1,21±0,12	108,16±21,34	411,23±32,79	2135,04±284,80	1,14±0,59	/	2,23±1,30	7,69±6,36
		p	<b>0,010</b>	0,105	<b>0,029</b>	0,775	0,699	0,426	/	0,764	<b>0,014</b>
4	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	28,17	1,12	88,10	404,31	2161,50	1,07	/	1	9
		Povprečna vrednost ± SD	27,32±8,75	1,14±0,09	86,95±12,40	412,13±58,84	2071,83±194,53	1,23±0,57	/	1,65±0,85	9,93±5,00
	Vitamin E (N=13)	Mediana vrednost	80,20	1,22	116,90	409,94	2160,09	0,90	/	2	4
		Povprečna vrednost ± SD	75,59±25,34	1,23±0,12	110,15±20,51	408,2±27,75	2175,88±290,70	1,13±0,60	/	1,92±1,11	5,54±4,00
		p	<b>0,000</b>	<b>0,050</b>	<b>0,002</b>	0,830	0,294	0,694	/	0,496	<b>0,019</b>
5	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	28,00	1,16	84,29	399,70	2226,90	1,26	18,35	1	8
		Povprečna vrednost ± SD	27,5±11,23	1,14±0,08	89,6±18,76	410,04±62,74	2143,66±252,31	1,35±0,56	22,52±15,59	1,69±0,85	9,62±6,22
	Vitamin E (N=13)	Mediana vrednost	58,80	1,23	100,40	397,06	2198,96	0,99	31,60	1	2
		Povprečna vrednost ± SD	63,6±28,22	1,2±0,08	108,33±25,99	405,73±39,35	2204,8±273,18	1,20±0,67	40,38±29,57	1,38±0,65	3,86±4,47
		p	<b>0,001</b>	0,098	<b>0,046</b>	0,836	0,559	0,528	0,075	0,312	<b>0,004</b>

#### **4.4 Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži med skupinama atopikov (placebo in vitamin E) in skupino zdravih psov pred pričetkom (obisk 1) in ob koncu zdravljenja (obisk 5)**

Primerjava skupin placebo in vitamin E pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) s kontrolno skupino zdravih psov, je pokazala statistično značilno nižje vrednosti vitamina E v plazmi in vrednosti GPX, ter statistično značilno višje vrednosti MDA za obe skupini v primerjavi s kontrolno skupino zdravih psov (Tabela 3). Primerjava placeba s kontrolno skupino zdravih psov ob koncu zdravljenja je pokazala statistično značilno nižje vrednosti vitamina E v plazmi in vrednosti GPX, ter statistično značilno višje vrednosti MDA v skupini placebo (Tabela 3). Koncentracija vitamina E v koži je bila pri tej skupini ob obisku 5 numerično nižja v primerjavi s kontrolno skupino zdravih psov, vendar ne statistično značilna. Primerjava vitamin E skupine s kontrolno skupino zdravih psov ob koncu zdravljenja (obisk 5) je pokazala statistično značilno nižje vrednosti GPX, statistično značilno višje vrednosti SOD v skupini vitamin E (Tabela 3). Koncentracija MDA je bila v skupini vitamin E v primerjavi s kontrolno skupino le numerično višja, vendar zelo blizu meje statistične značilnosti ( $p=0,053$ ). Koncentracija vitamina E v koži je bila ob obisku 5 primerljiva s kontrolno skupino zdravih psov.

Tabela 3: Primerjava vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA, koncentracije vitamina E v plazmi in koži med skupino zdravih psov ter skupino placebo in vitamin E pred začetkom (obisk 1) in ob koncu zdravljenja (obisk 5).

Obisk	Skupina	Parameter	VitE (nmol/ml)	TAC (mmol/l)	TACBF (nmol ekvivalentov trolox/ml)	GPX (U/g Hgb)	SOD (U/g Hgb)	MDA (nmol/ml)	VitE koža (µg/g kože)
1	Zdravi (N=17)	Mediana vrednost	52,89	1,13	90,00	494,01	2071,91	0,73	19,70
		Povprečna vrednost ± SD	50,30±19,84	1,15±0,10	95,26±30,55	496,98±62,03	1999,95±241,31	0,79±0,24	42,32±44,16
	Placebo (N=13)	Mediana vrednost	30,79	1,07	84,45	435,70	2166,19	1,17	26,10
		Povprečna vrednost ± SD	29,07±9,14	1,08±0,07	83,84±17,52	443,68±71,34	2105,4±266,29	1,38±0,66	37,63±30,25
		p <sup>a</sup>	<b>0,001</b>	0,065	0,246	<b>0,037</b>	0,266	<b>0,008</b>	0,746
	Vitamin E (N=13)	Mediana vrednost	27,70	1,12	82,60	415,53	2074,02	1,69	23,30
		Povprečna vrednost ± SD	27,80±8,85	1,13±0,07	86,68±14,06	413,79±33,66	2130,21±282,24	1,58±0,48	29,22±20,93
		p <sup>b</sup>	<b>0,000</b>	0,625	0,378	<b>0,000</b>	0,184	<b>0,000</b>	0,333
	5	Zdravi (N=17)	Mediana vrednost	52,89	1,13	90,00	494,01	2071,91	0,73
Povprečna vrednost ± SD			50,30±19,84	1,15±0,10	95,26±30,55	496,98±62,03	1999,95±241,31	0,79±0,24	42,32±44,16
Placebo (N=13)		Mediana vrednost	28,00	1,16	84,29	399,70	2226,90	1,26	18,35
		Povprečna vrednost ± SD	27,52±11,23	1,14±0,08	89,6±18,76	410,04±62,74	2143,66±252,31	1,35±0,56	22,52±15,59
		p <sup>a</sup>	<b>0,001</b>	0,758	0,568	<b>0,001</b>	0,124	<b>0,004</b>	0,103
Vitamin E (N=13)		Mediana vrednost	58,80	1,23	100,40	397,06	2198,96	0,99	31,60
		Povprečna vrednost ± SD	63,60±28,22	1,20±0,08	108,33±25,99	405,73±39,35	2204,80±273,18	1,20±0,67	40,38±29,57
		p <sup>b</sup>	0,141	0,178	0,238	<b>0,000</b>	<b>0,038</b>	0,053	0,893

p<sup>a</sup> -primerjava placebo skupine s skupino zdravih psov ; p<sup>b</sup> - primerjava vitamin E skupine s skupino zdravih psov ;

#### **4.5 Grafični prikazi primerjav vrednosti vitamina E v koži, srbeža in CADESI-03 med posameznimi skupinami živali pred pričetkom zdravljenja (obisk 1), med zdravljenjem (obisk 2,3,4) in ob koncu zdravljenja (obisk 5)**

Vrednosti parametrov vitamina E v koži, srbeža in CADESI-03 niso sledili normalni Gaussovi porazdelitvi, zato smo za ilustrativen grafični prikaz podatkov uporabili okvir z ročaji (angl. box and whiskers plot). Grafi 1-3 prikazujejo primerjavo vrednosti vitamina E v koži (Slika 1), srbeža (Slika 2) in vrednosti CADESI-03 (Slika 3) med skupinami.

Območje vrednosti (Košmelj, 2007) med 5 in 95 percentilom je razdeljeno na:

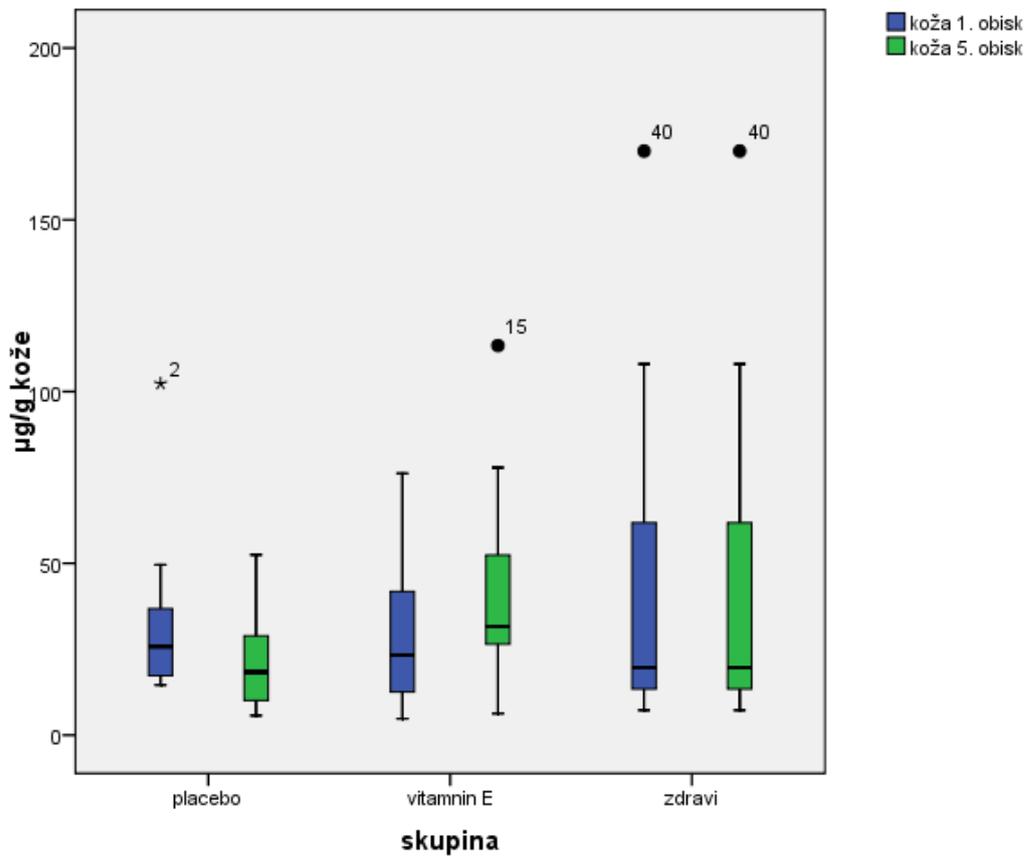
- barvni okvir, ki vključuje vrednosti znotraj 2. in 3. kvartila,
- vodoravno črto, ki je mediana vrednost in
- ročaje, ki predstavljajo spodnjih in zgornjih 25 % vrednosti.

Točke (\*, ●) so vrednosti, ki so izven območja 5 – 95 percentila.

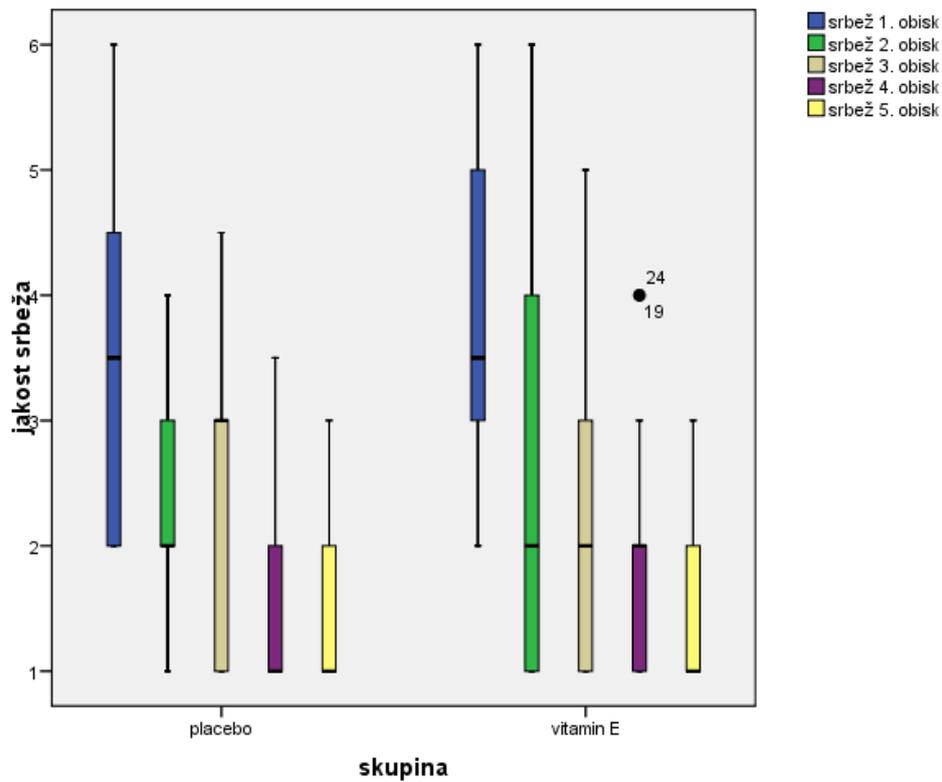
\* osamelec

● ekstremni osamelec

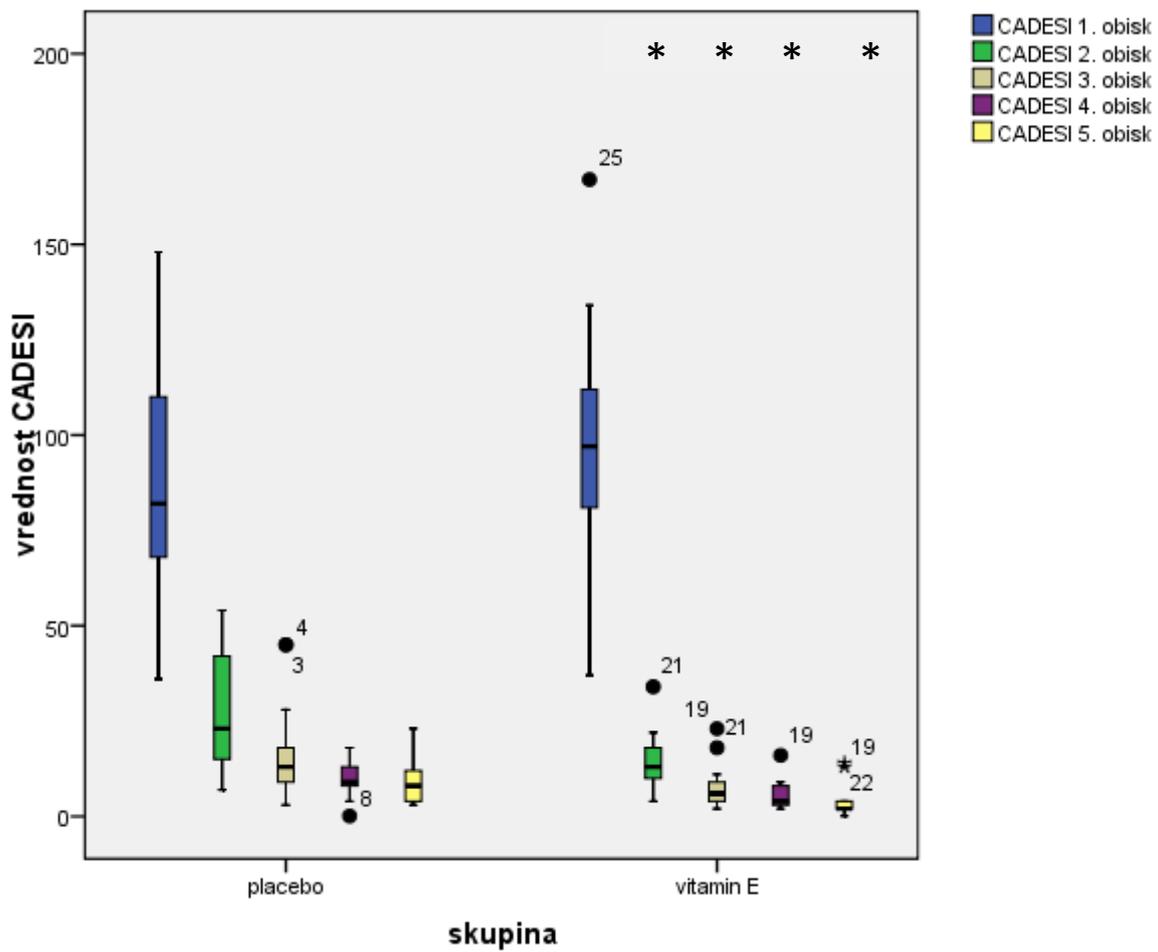
\*  $p < 0,05$



Slika 1: Primerjava vrednosti vitamina E v koži med skupinami pred zdravljenjem in ob koncu zdravljenja



Slika 2: Primerjava vrednosti srbeža med skupino placebo (zdravljeni s feksofenadinom in placebom) in skupino vitamin E (zdravljeni s feksofenadinom in vitaminom E) pred in med zdravljenjem



Slika 3: Primerjava vrednosti CADESI-03 med skupino placebo (zdravljeni s feksofenadinom in placebom) in skupino vitamin E (zdravljeni s feksofenadinom in vitaminom E) pred in med zdravljenjem

#### 4.6 Število psov z določenimi kožnimi spremembami v placebo in vitamin E skupini po CADESI-03 točkovanju

Tabela 4: Število psov v placebo skupini z določenimi kožnimi spremembami na določenem predelu telesa pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) ter ob koncu zdravljenja (obisk 5).

CADESI-03 obisk			eritem		lihenifikacija		ekskoriacija		alopecija	
			1	5	1	5	1	5	1	5
Obraz		Preauricular	1	5						
		Periokular	2	4			1			
		Perilabial	3	7		1		1		
		Gobec	4	7		1				
		Brada	5	5	1					
Glava		Dorzalno	6	1						
Uhelj	Levi	Konveksno	7	4	1	1	1			
		Konkavno	8	13	12	3	2	2	1	1
	Desni	Konveksno	9	3	1	1	1			
		Konkavno	10	13	12	3	2	2	1	1
Vrat		Dorzalno	11	1	1					
		Ventralno	12	7						
		Lateralno	13	6						
		Levo	14	6						
Pazduha		Levo	15	12	2	3		1		1
		Desno	16	12	2	3		1		1
Prsnica			17	12		2				
Prsni koš	Lateralno	Dorzalno	18	1						
		Levo	19	10	1	2				
		Desno	20	10	1	2				
Ingvinalno področje		Levo	21	13	5	7	2		3	
		Desno	22	13	5	6	2		2	
Trebuh			23	10	3	4	1		1	
Ledveno področje		Dorzalno	24	3						
Bok		Levo	25	6						
		Desno	26	6						
Prednja noga	Levo	Medialno	27	10						
		Lateralno	28	6	1	1				
		Upogibna stran komolca	29	7		1				
	Desno	Upogibna stran zapestja	30	5	1	1				
		Medialno	31	10						
		Lateralno	32	5						
		Upogibna stran komolca	33	7		1		1		
Upogibna stran zapestja	34	6		1		1				
Prednja šapa	Levo	Palmarno metakarpalno	35	10	3					
		Dorzalno metakarpalno	36	12	2	1				
		Palmarno falangealno	37	10						
		Dorzalno interdigitalno	38	12		1				
	Desno	Palmarno metakarpalno	39	11	2					
		Dorzalno metakarpalno	40	12	2	1				
		Palmarno falangealno	41	11	4	1				
Dorzalno interdigitalno	42	12		2						
Zadnja noga	Levo	Medialno	43	6						
		Lateralno	44	5	1					
		Upogibna stran kolena	45	4						
	Desno	Upogibna stran tarzusa	46	3						
		Medialno	47	6						
		Lateralno	48	5						
Upogibna stran kolena	49	4								
Upogibna stran tarzusa	50	4								
Zadnja šapa	Levo	Palmarno metakarpalno	51	11	1					
		Dorzalno metakarpalno	52	11	2	1				
		Palmarno falangealno	53	11	4	2				
		Dorzalno interdigitalno	54	11	1					
	Desno	Palmarno metakarpalno	55	11	1	1				
		Dorzalno metakarpalno	56	12	2	1				
Palmarno falangealno	57	11	4	2						
Dorzalno interdigitalno	58	12	1	1						
Perianalno področje			59	6						
Perineum			60	6	1					
Rep		Ventralno	61	2						
		Dorzalno	62	1						

Tabela 5 : Število psov v vitamin E skupini z določenimi kožnimi spremembami na določenem predelu pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) ter ob koncu zdravljenja (obisk 5).

CADESI-03		eritem		lihenifikacija		ekskoriacija		alopecija	
obisk		1	5	1	5	1	5	1	5
Obraz	Preauricular	1	2						
	Periokular	2	4	1					
	Perilabial	3	6	1					
	Gobec	4	6						
	Brada	5	5	1					
Glava	Dorzalno	6	1						
Uhelj	Levi	Konveksno	7	1					
		Konkavno	8	12	5	1			
	Desni	Konveksno	9	1					
		Konkavno	10	12	5	1			
Vrat	Dorzalno	11	2	1					
	Ventralno	12	6	2	1		1		
	Lateralno	Levo	13	7					
		Desno	14	7					
Pazduha	Levo	15	13	1	3		1		
	Desno	16	13	1	3		1		
Prsnica		17	11	2	1		1		
Prsni koš	Dorzalno	18	1		1				
	Lateralno	Levo	19	13	2	1			
		Desno	20	13	2	1			
Ingvinalno področje	Levo	21	13	2	3		2		
	Desno	22	13	2	3		2		
Trebuh		23	13	2	3		2		
Ledveno področje	Dorzalno	24	1						
Bok	Levo	25	4						
	Desno	26	4						
Prednja noga	Levo	Medialno	27	9					
		Lateralno	28	5					
		Upogibna stran komolca	29	5					
		Upogibna stran zapestja	30	3					
	Desno	Medialno	31	9					
		Lateralno	32	5					
		Upogibna stran komolca	33	5					
		Upogibna stran zapestja	34	3					
Prednja šapa	Levo	Palmarno metakarpalno	35	10	1	1			
		Dorzalno metakarpalno	36	13	1	1			
		Palmarno falangealno	37	12	2	1			
		Dorzalno interdigitalno	38	12	1	1			
	Desno	Palmarno metakarpalno	39	10					
		Dorzalno metakarpalno	40	13					
		Palmarno falangealno	41	12	1				
		Dorzalno interdigitalno	42	12					
Zadnja noga	Levo	Medialno	43	8	1				
		Lateralno	44	2					
		Upogibna stran kolena	45	2					
	Desno	Upogibna stran tarzusa	46	1					
		Medialno	47	9	1				
		Lateralno	48	2					
Zadnja šapa	Levo	Upogibna stran kolena	49	1					
		Upogibna stran tarzusa	50	1					
		Palmarno metakarpalno	51	10					
		Dorzalno metakarpalno	52	13					
	Desno	Palmarno falangealno	53	12					
		Dorzalno interdigitalno	54	12					
		Palmarno metakarpalno	55	10					
		Dorzalno metakarpalno	56	13					
Perianalno področje	Palmarno falangealno	57	12						
	Dorzalno interdigitalno	58	12						
Perineum		59	6		1		1		
Rep	Ventralno	60	5	1	1		1		
	Dorzalno	61	3	1	1		1		
		62	2						

## 5 DISKUSIJA

Z raziskavo smo želeli določiti vrednosti TAC, aktivnost GPX in SOD ter koncentracijo MDA in vitamina E v plazmi in koži pri zdravih psih ter ugotoviti, ali so, oziroma kako, so ti parametri spremenjeni pri psih z atopičnim dermatitisom (AD) pred začetkom zdravljenja in kako nanje vpliva dodajanje vitamina E med 8 tedenskim zdravljenjem.

Znano je, da v patogenezi AD sodelujejo poleg genetskih dejavnikov tudi nevroimunološki dejavniki, moteno delovanje kožne bariere (ki postane prepustna za antigene in mikroorganizme iz okolja ter tekočino iz organizma) in spremenjeno delovanje imunskega sistema (Leung in Soter, 2001; Bonness in Bieber, 2007). Veliko raziskav v zadnjem času dokazuje tudi udeležnost oksidativnega stresa v patogenezi AD pri ljudeh (Tsuboi in sod., 1998; Omata in sod., 2001; Antille in sod., 2002; Niwa in sod., 2003; Nakai in sod., 2009). Nastanek oksidativnega stresa povezujemo s povečanim nastankom ROS v organizmu in / ali izčrpanjem antioksidantnih obrambnih mehanizmov (Valko in sod., 2007). Vnetje kože pri AD se histološko kaže z intenzivno infiltracijo limfocitov, monocitov in eozinofilnih granulocitov, ki izločajo bioaktivne substance, proinflammatory citokine in ROS (Fuchs in sod., 2001; Briganti in Picardo, 2003). Reaktivne kisikove zvrsti sodelujejo v patogenezi alergijskega vnetja in so tako eden od povzročiteljev poškodbe tkiv pri AD (Tsuboi in sod., 1998; Fuchs in sod., 2000; Niwa in sod., 2003; Okayama, 2005; Nakai in sod., 2009). Znano je, da je vitamin E kot lipofilni neencimski antioksidant vključen v številne fiziološke procese in tako ščiti celice pred oksidativnimi poškodbami. V membranah celic zavira lipidno peroksidacijo in igra pomembno protivnetno vlogo, s tem pa omogoča znižanje pojavnosti in resnosti patoloških procesov v koži (Nachbar in Korting, 1995). Nekatere študije so pokazale izboljšanje ali skoraj popolno remisijo AD pri ljudeh ob dodajanju vitamina E (Tsourelis-Nikita in sod., 2002; Javanbakht in sod., 2011), zato bi uporaba vitamina E lahko bila dober terapevtski dodatek pri zdravljenju AD psov.

V literaturi s področja veterinarske medicine nismo zasledili raziskav, ki bi preučevale antioksidantni status pri psih z AD kot tudi ne uporabo vitamina E. Prav tako je bilo v dostopni literaturi težko najti referenčne vrednosti za antioksidantne encime, TAC, MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži pri zdravih psih, za postavitve katerih bi uporabili isti postopek priprave vzorcev in metode določanja kot smo jih uporabili v naši raziskavi. Znane so vrednosti posameznih parametrov antioksidantnega statusa, koncentracije MDA in vitamina E v plazmi pri manjših skupinah zdravih psov (Baker in sod., 1986; Nemeč in sod.,

2000; Todorova in sod., 2005). Glede na to, da se pri teh raziskavah priprave vzorcev in metodologije določanja posameznih antioksidantnih parametrov razlikujejo, bi bilo dobljene vrednosti težko primerjati z našimi, zato smo se odločili določiti vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, MDA in koncentracije vitamina E v koži in plazmi zdravih psov in psov z atopičnim dermatitisom z metodami, ki so nam bile na voljo.

### **5.1 Antioksidantni status, vitamin E in MDA pri zdravih psih in psih z atopičnim dermatitisom pred začetkom zdravljenja**

Pri ljudeh z AD oksidativnega stresa niso vrednotili samo s povečanimi vrednostmi biomarkerjev za oksidativne poškodbe lipidov, proteinov in DNA v različnih bioloških tekočinah in tkivih (Tsuboi in sod., 1998; Omata in sod., 2001; Niwa in sod., 2003; Tsukahara in sod., 2003; Nakai in sod., 2009), ampak tudi s spremenjenimi vrednostmi različnih antioksidantov (Juhlin in sod., 1982; Niwa in sod., 2003; Tsukahara in sod., 2003). V naši raziskavi smo antioksidantni status psov z AD določali tako z meritvami aktivnosti antioksidantnih encimov, kot sta GPX v polni krvi in SOD v eritrocitih, kot tudi z določanjem koncentracije celokupne antioksidantne kapacitete v plazmi. Slednjo smo določali z dvema različnima metodama. Obseg lipidne peroksidacije, kot posledice oksidativne poškodbe lipidov, pa smo ovrednotili z merjenjem koncentracije MDA v plazmi. Koncentracija MDA v različnih bioloških vzorcih velja za enega najpomembnejših in najbolj uporabljenih kazalcev lipidne peroksidacije, kot posledice oksidativnega stresa (Esterbauer in sod., 1991; Gallaher in sod., 1993).

Pri psih z AD pred pričetkom zdravljenja (obisk 1) nismo ugotovili statistično značilnih razlik med placebo skupino in vitamin E skupino pri nobenem od merjenih parametrov kar pomeni, da sta bili naključno izbrani skupini uravnoteženi.

Pred pričetkom zdravljenja smo ugotovili statistično značilno višjo koncentracijo MDA, statistično značilno nižjo aktivnost GPX in numerično višjo, vendar statistično neznačilno, aktivnost SOD pri obeh skupinah psov z AD v primerjavi z zdravimi, kar kaže na vpletenost oksidativnega stresa v patogenezo AD.

Antioksidantna encima, SOD in GPX, predstavljata primarni sistem antioksidantne obrambe pred ROS. SOD uniči visoko reaktivne proste superoksidne radikale tako, da jih pretvori v

vodikov peroksid, tega pa GPX pretvori v vodo. Aktivnost teh dveh encimov je občutljiv kazalec oksidativnega stresa. O zmanjšani aktivnosti GPX in o povečani aktivnosti SOD so poročali pri različnih kožnih boleznih pri ljudeh, vključno z AD (Polla in sod., 1992; Briganti in sod., 2001; Okayama, 2005), in ju neposredno povezali s povečanim nastankom ROS (Juhlin in sod., 1982; Jain in sod., 1988; Passi in sod., 1991; Kökçem in Naziroğlu, 1999; Niwa in sod., 2003). Zmanjšana aktivnost GPX in povečana aktivnost SOD pri bolnih psih v primerjavi z zdravimi v naši raziskavi bi tako lahko bila posledica povečane tvorbe kisikovih prostih radikalov pri AD, kot je na primer superoksidni radikal. Dokazano je, da le ti inaktivirajo GPX in tako znižajo aktivnost tega encima (Blum in Fridovich., 1985; Misso in sod., 1996). Povečano aktivnost SOD lahko pripišemo posledici indukcije sinteze tega encima kot odgovor na povečano nastajanje ROS, predvsem superoksidnega radikala pri AD. Podobno so ugotovili tudi pri ljudeh z urtikarijo (Briganti in sod., 2001).

Kadar količina nastalih ROS preseže kapaciteto antioksidantov, to lahko povzroči povečan obseg lipidne peroksidacije in posledično povečano koncentracijo MDA (Bickers in Athar, 2006), kar smo ugotovili tudi v raziskavi.

Koncentracija MDA je bila pred pričetkom zdravljenja pri obeh skupinah psov z AD statistično značilno višja v primerjavi s skupino zdravih psov. MDA je produkt lipidne peroksidacije in je pokazatelj oksidativnih poškodb lipidov in s tem celic in tkiv. Mnogo avtorjev je poročalo o povišanih vrednostih kazalcev lipidne peroksidacije kot so MDA, 4-HNE (4-hidroksi-2-nonenal) in akrolein lizina v plazmi, serumu, urinu, in bioptih kože ljudi z AD (Niwa in sod., 2003; Tsukahara in sod., 2003), psoriazo (Kökçem in Naziroğlu, 1999; Utas in sod., 2002; Baz in sod., 2003; Kadam in sod., 2010) in lihenus planus (Sezer in sod., 2007; Aly and Shahin, 2010). Odkar so ugotovili, da je koncentracija MDA povišana pri različnih bolezenskih stanjih ljudi, se je določanje tega biomarkerja začelo množično uporabljati in je tako eden največkrat merjenih parametrov pri oceni oksidativnega stresa (Del Rio in sod., 2005; Grotto in sod., 2009).

Menimo, da rezultati naše raziskave kažejo, da je pri psih z AD prišlo do povečane tvorbe ROS in s tem oksidativnega stresa zaradi vnetnega procesa, kar se kaže posledično s povečanim obsegom lipidne peroksidacije ter s tem povečano tvorbo MDA. Preliminarni rezultati raziskave na psih z AD so pokazali statistično značilno pozitivno povezavo med plazemsko koncentracijo MDA in CADESI (Plevnik Kapun in sod., 2012).

Pred pričetkom zdravljenja smo ugotovili statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi pri obeh skupinah psov z AD v primerjavi s skupino zdravih. Nasprotno pa primerjava koncentracij vitamina E v koži psov z AD v primerjavi z zdravimi pred pričetkom zdravljenja (1. obisk) ni pokazala statistično značilnih razlik. Naše ugotovitve se ujemajo z ugotovitvami pri ljudeh s seboroičnim dermatitisom (Passi in sod., 1991) in psoriazo (Jain in sod., 1988; Kökçem in Naziroğlu, 1999; Briganti in Picardo, 2003) kjer so prav tako izmerili znižano plazemsko koncentracijo vitamina E. V obstoječi literaturi podatka za atopični dermatitis nismo našli. Dobljene rezultate so raziskovalci razlagali s povečanim nastajanjem lipoperoksidov in ostalih ROS v koži s posledično povečanim perifernim privzemom vitamina E iz plazme (distribucija na mesto vnetja). Tudi v našem primeru bi statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi atopičnih psov lahko pripisali povečani distribuciji vitamina E v tkiva. Pri tem bi pričakovali normalizacijo vrednosti ob dodajanju vitamina E s hrano, kar se je dejansko zgodilo. Antille in sodelavci (2002) pa so poročali o povečani koncentraciji vitamina E v koži pri ljudeh z AD, Raho in sodelavci (2003) pa o povečani koncentraciji vitamina E v koži ljudi s kronično idiopatsko urtukarijo. Rezultate so podprli z razlago, da kronično vnetje stimulira nastajanje antioksidantov v koži in posledično povzroči dvig koncentracije vitamina E.

Živi organizmi so v evoluciji razvili kompleksen antioksidantni sistem, da bi se lahko uspešno zoperstavili delovanju ROS. Med pomembnejše antioksidante različnih bioloških tekočin spadajo albumini, GPX, askorbinska kislina,  $\alpha$ -tokoferol in  $\beta$ -karoten. Merjenje vsakega antioksidanta posebej v plazmi, serumu, urinu in drugih bioloških tekočinah je zamudno, prav tako pa je nemogoče na ta način ovrednotiti možne interakcije različnih antioksidantov med seboj. Zato so razvili številne metode vrednotenja TAC v različnih bioloških vzorcih, ki pa se med seboj precej razlikujejo (Prior in Cao, 1999). TAC je biokemični parameter, ki se uporablja za ovrednotenje celokupne antioksidantne kapacitete v plazmi in drugih telesnih tekočinah, ki so posledica bodisi vnosa in/ali proizvodnje antioksidantov ter njihove porabe pri običajni ali povečani stopnji proizvodnje ROS. Zmogljivost antioksidantov in njihove sinergistične interakcije se ocenjuje s sposobnostjo vzdrževanja ravnotežja med oksidanti in antioksidanti *in vivo*. Izčrpavanje TAC, ki jo povzroči OS, se sproži s sprostitvijo zalog antioksidantov v telesu, predvsem iz jeter in maščobnega tkiva, ter z indukcijo ali aktiviranjem antioksidantnih encimov (Lamont in sod., 1997; Cao in Prior, 1998; Ghiselli in sod., 2000). Zaradi težav pri merjenju vsake komponente antioksidantov posebej in interakcij

med različnimi sestavinami antioksidantov v vzorcu, je bilo razvitih več različnih metod za ocenjevanje TAC v serumu ali plazmi. Te metode se med seboj razlikujejo, zato rezultati različnih metod med seboj niso primerljivi (Prior in Cao, 1999; Ghiselli in sod., 2000). Treba je poudariti, da se relativni prispevki različnih komponent antioksidantov v celokupno vrednost TAC precej razlikujejo, odvisno od analiznega postopka. Ker imajo vsi testi svoje specifične omejitve, bi se lahko skupno zmogljivost antioksidantov v bioloških sistemih, kot sta na primer serum ali plazma, najbolj natančno določalo z uporabo "baterije" različnih metod hkrati (Halliwell in Gutteridge, 1990; Prior in Cao, 1999). V naši raziskavi smo zato plazemske vrednosti TAC določali z uporabo dveh metod in sicer s troloksu ekvivalentne antioksidantne kapacitete (metoda TEAC z reagenčnim kompletom TAS), ki zajame vse vodotopne in v maščobah topne antioksidante prisotne v plazmi, in z metodo določanja TAC, ki temelji le na antioksidantih, topnih v maščobah (metoda z reagenčnim kompletom PHOTOCHEM). Rezultati naše raziskave z uporabo obeh metod niso pokazali statistično značilnih razlik v vrednosti TAC med skupinami pred pričetkom zdravljenja, kar kaže na to, da sistemski antioksidantni obrambni mehanizmi niso bili popolnoma izčrpani pri psih z zmerno stopnjo AD. Avtorji raziskave, kjer so uporabili enak način merjenja TAC (Severin in sod., 1999) so poročali, da ni bilo razlike v vrednostih TAC pri ljudeh s psorizao v primerjavi z zdravimi prostovoljci.

## **5.2 Antioksidantni status, vitamin E in MDA pri psih z AD med zdravljenjem**

Pri ljudeh je dokazano, da je vitamin E kot močan antioksidant vključen v številne fiziološke procese in da je njegovo pomanjkanje povezano z dvigom koncentracije ROS, poškodbami celic in posledično z poškodbami različnih tkiv vključujoč vnetje, kar vodi v različna kožna obolenja (Jain in sod., 1988; Passi in sod., 1991; Kökçem in Naziroğlu, 1999; Briganti in Picardo, 2003). Različni avtorji so potrdili, da so ROS udeleženi tudi v patogenezi AD (Tsuboi in sod., 1998; Briganti in Picardo, 2003; Tsukahara in sod., 2003).

V času zdravljenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama psov z AD pri meritvah aktivnosti GPX in SOD, kar kaže na to, da dodajanje vitamina E v obdobju 8 tednov ni vplivalo na spremembo aktivnosti antioksidantnih encimov. Smo pa ob koncu zdravljenja ugotavili statistično značilno nižje vrednosti GPX v obeh skupinah atopičnih psov v primerjavi z zdravimi. Dobljene rezultate bi po našem mnenju lahko pripisali posledici povečanega nastajanja ROS, predvsem - superoksidnega radikala, ki inaktivira ter s tem zniža

aktivnost GPX (Blum in Fridovich, 1985). Misso in sodelavci (1996) navajajo, da je nižja aktivnost GPX lahko povezana tudi s povečano koncentracijo IgE v krvnem obtoku. Imunoglobulini E namreč stimulirajo nastajanje kisikovih prostih radikalov, kot je superoksidni radikal, le ta pa inaktivira GPX. Prisotnost alergijske reakcije tipa I, za katero je značilno povečanje koncentracije IgE in pri kateri IgE sodelujejo, smo dokazali pri vseh naših psih z AD. Ob koncu zdravljenja (5. obisk) nismo ugotovili statistično značilne razlike v aktivnosti SOD pri skupini vitamin E v primerjavi s skupino placebo, kar pomeni, da do indukcije sinteze SOD po dodajanju vitamina E ni prišlo. Smo pa ob koncu zdravljenja ugotovili statistično značilno višjo aktivnost SOD vitamin E skupine v primerjavi s skupino zdravih psov.

Medsebojna primerjava obeh skupin psov z AD ob obiskih 2., 3., 4., in 5 ni pokazala statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA, kar kaže na to, da dodajanje vitamina E ni zmanjšalo obsega lipidne peroksidacije pri AD, smo pa ob koncu zdravljenja ugotavljali statistično značilne višje koncentracije MDA placebo skupine v primerjavi s skupino zdravih psov. Dobljene rezultate pripisujemo povečanemu obsegu lipidne peroksidacije pri psih z AD, ki niso bili zdravljeni z vitaminom E. Koncentracija MDA vitamin E skupine se je med zdravljenjem numerično znižala in približala vrednosti pri zdravih psih.

Podobno kot pred začetkom zdravljenja tudi med zdravljenjem (obisk 2, 3, 4 in 5) nismo ugotovili statistično značilnih razlik v vrednostih TAC med skupinama psov z AD, merjeno po metodi TEAC. Prav tako s to metodo nismo ugotovili statistično značilnih razlik v vrednosti TAC med obema skupinama v primerjavi s skupino zdravih psov ob koncu zdravljenja. Smo pa med zdravljenjem ugotovili statistično značilne višje vrednosti TAC, merjene po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah (TACBF) pri vitamin E skupini v primerjavi s placebo skupino. To lahko razložimo z dejstvom, da je prispevek  $\alpha$ -tokoferola k meritvam po metodi TEAC le 1,74% (Cao in Prior, 1998), kar ima za posledico, da tudi podvojena koncentracija  $\alpha$ -tokoferola v serumu oziroma plazmi premalo vpliva na povečanje vrednosti TAC, ki bi ga TEAC metoda lahko zaznala (Severin in sod., 1999). Nasprotno pa metoda, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah, dodajanje vitamina E dobro zazna. Na ta način torej lahko pojasnimo statistično značilne višje vrednosti TAC pri vitamin E skupini v primerjavi s placebo skupino med zdravljenjem. Naše ugotovitve potrjujejo trditev, da rezultati dobljeni s pomočjo različnih metod merjenja TAC, med seboj niso primerljivi. Ugotavljamo torej, da je za spremljanje učinkov zdravljenja z vitaminom E primerno merjenje TAC po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobi. Statistično

značilna razlika med skupinama psov z AD se je pokazala že ob drugem obisku in vztrajala vse do konca raziskave. Na podlagi dobljenih rezultatov menimo, da so vrednosti TAC, merjene po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah, dober pokazatelj prisotnosti ROS pri psih z AD in uporabne tudi za spremljanje uspešnosti zdravljenja z antioksidantom  $\alpha$ -tokoferolom.

Že 14. dan zdravljenja (2. obisk) in ves čas v nadaljevanju smo ugotavljali statistično značilno višjo koncentracijo vitamina E v plazmi psov vitamin E skupine v primerjavi s placebo skupino. Poleg tega smo ugotavljali statistično značilno nižje vrednosti plazemske koncentracije vitamina E v placebo skupini v primerjavi s skupino zdravih psov tudi ob koncu zdravljenja, kar lahko pripišemo povečani distribuciji vitamina E v tkiva pri psih z aktivnim AD. Nasprotno pa ob koncu zdravljenjem nismo več ugotavili statistično značilne razlike plazemske koncentracije vitamina E v vitamin E skupini v primerjavi s skupino zdravih psov. Numerična vrednost plazemske koncentracije vitamina E v vitamin E skupini je celo presegla plazemsko koncentracijo vitamina E v skupini zdravih psov, kar je posledica dodajanja vitamina E. Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da  $\alpha$ -tokoferol v odmerku 8,1 IE/kg t.m. 1x dnevno zadošča za nadomeščanje potreb po tem antioksidantu pri psih z zmerno obliko AD.

Koncentracija vitamina E v bioptih kože se statistično ni razlikovala med skupinama psov z AD ob koncu zdravljenja (5. obisk) bila pa je numerično (blizu meje statistične značilnosti) višja v vitamin E skupini. Prav tako ob koncu zdravljenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik skupin atopičnih psov v primerjavi s skupino zdravih psov. Zaradi visoke vsebnosti maščobe v koži pričakujemo od lipofilnega antioksidanta, kot je vitamin E, da igra pomembno vlogo pri lovljenju ROS med oksidativnim stresom (Jewell in sod., 2002), ter tako zavira lipidno peroksidacijo in procese vnetja (Nachbar in Korting, 1995). Zvišanje njegove koncentracije v koži s hkratnim izboljšanjem kliničnega stanja živali zato pripisujemo dodajanju vitamina E.

Primerjava med skupinama psov z AD je že 14. dan zdravljenja pokazala statistično značilno nižje vrednosti CADESI-03 točkovanja vitamin E skupine in tako vztrajala vse do konca raziskave. Izboljšanje kliničnega stanja smo opazili kot zmanjševanje ali izginjanje sprememb na koži, kot so eritem, lihenifikacija, ekskoriacija in alopecija, ki smo jih na 62-delih telesa

ocenjevali po CADESI-03 sistemu točkovanja. Statistično značilno izboljšanje kliničnega stanja psov vitamin E skupine lahko pripišemo dodajanju vitamina E, podobno kot so ugotovili v raziskavah pri ljudeh (Tsourelis-Nikita in sod., 2002; Oh in sod., 2010; Javanbakht in sod., 2011). Vitamin E zavira nastajanje in s tem količino IgE v krvi ljudi z AD in na ta način zmanjša nastajanje kisikovih prostih radikalov, kar posledično zmanjša OS (Misso in sod., 1996; Tsourelis-Nikita in sod., 2002). Pri ljudeh z AD je bila dokazana povezava med plazemsko koncentracijo vitamina E in izboljšanjem kliničnega stanja (Fogarty in sod., 2000; Tsourelis-Nikita in sod., 2002; Oh in sod., 2010; Javanbakht in sod., 2011).

Kot merilo učinkovitosti zdravljenja smo vrednotili tudi jakost srbeža psov z AD. Primerjava med skupinama psov z AD ni pokazala statistično značilnih razlik. Ker so bili psi v obeh skupinah zdravljeni z antihistaminikom *feksofenadinom*, se je jakost srbeža zniževala v obeh skupinah v primerjavi z izhodiščno vrednostjo ter ob 4. in 5. obisku, pri obeh skupinah, segela pod polovico vrednosti pred zdravljenjem. V skupini, ki je prejela vitamin E, se je jakost srbeža znižala močnejše, vendar je bila razlika med skupinama premajhna, da bi bila statistično značilna. Avtorji (Olivry in sod., 2003) v literaturi označujejo kot klinično uspešno, kadar se jakost srbeža zniža za 50% (srbež<sub>50</sub>), kar lahko v naši raziskavi pripišemo uspešnosti zdravljenja s *feksofenadinom* in ne dodajanju vitamina E, saj razlika med skupinama psov z atopičnim dermatitisom ni bila statistično značilna.

Na osnovi vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, koncentracije MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži atopičnih psov pred zdravljenjem in ob koncu zdravljenja menimo, da je oksidativni stres vključen v patogenezo AD pri psih, do iztrošenosti kompenzatornih antioksidantnih obrambnih mehanizmov pa ni prišlo. Povečanje celokupne antioksidantne kapacitete (TACBF) in koncentracije vitamina E v plazmi psov, ki so bili z vitaminom E zdravljeni, ob ugodnem kliničnem odzivu na dodajanje vitamina E nakazuje, da bi uporaba podporne terapije z vitaminom E bila smiselna z vidika zaviranja učinka prostih radikalov in s tem zmanjševanja vnetja v koži, ter z vidika stabilizacije celičnih membran in s tem preprečevanja dodatnih poškodb epidermisa, kar vse pripomore k zdravljenju.

## 6 SKLEPI

1. Pred pričetkom zdravljenja smo ugotovili statistično značilno nižje koncentracije vitamina E v plazmi psov z atopičnim dermatitisom v primerjavi z zdravimi psi. Statistično značilno višjo koncentracijo vitamina E v plazmi psov vitamin E skupine v primerjavi s placebo skupino smo ugotavljali od 14. dneva pa do konca 8 tedenskega zdravljenja. Statistično značilno nižja koncentracija vitamina E v plazmi psov, zdravljenih s placebom, se je v primerjavi z zdravimi obdržala vse do konca zdravljenja

Koncentracija vitamina E v koži bolnih psov, zdravljenih s placebom ter koži bolnih psov, zdravljenih z vitaminom E pred zdravljenjem kot tudi ob koncu zdravljenja ni bila statistično značilno različna. Ugotovili pa smo, da je bila koncentracija vitamina E v koži psov, zdravljenih s placebom pred zdravljenjem ter ob koncu zdravljenja numerično nižja v primerjavi z zdravimi. Nasprotno pa je koncentracija vitamina E v koži psov, ki so bili z vitaminom E zdravljeni, ves čas naraščala in se ob koncu raziskave numerično približala koncentraciji vitamina E v koži zdravih psov, kar pripisujemo dodajanju vitamina E. Pred pričetkom zdravljenja smo ugotovili statistično značilno nižjo aktivnost GPX ter statistično značilno višjo koncentracijo MDA pri obeh skupinah bolnih psov v primerjavi s skupino zdravih. Statistično značilna razlika obeh parametrov je bila prisotna tudi ob koncu zdravljenja pri skupini psov, zdravljenih s placebom. Med tem, ko je skupina psov, zdravljena z vitaminom E, imela v primerjavi z zdravimi ob koncu zdravljenja statistično značilno nižjo aktivnost GPX, statistično značilne razlike v koncentraciji MDA ob koncu zdravljenja nismo več ugotovili. V času zdravljenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama psov z AD pri meritvah aktivnosti GPX in SOD ter koncentraciji MDA.

2. Že 14. dan zdravljenja smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost celokupne antioksidantne kapacitete merjene po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah pri psih, zdravljenih z vitaminom E v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebom. Ta razlika se je obdržala do konca zdravljenja. Izboljšanje TACBF pripisujemo dodajanju vitamina E.
3. Primerjava med skupino psov, zdravljenih s placebom in skupino psov, zdravljenih z vitaminom E je že 14. dan zdravljenja pokazala statistično značilno nižje vrednosti CADESI-03 točkovanja skupine, zdravljene z vitaminom E. Ta razlika je vztrajala do

konca raziskave. Statistično značilno izboljšanje kliničnega stanja psov lahko pripišemo dodajanju vitamina E.

4. Potrdili smo hipotezo, da je v patogenezo atopičnega dermatitisa psov vključen oksidativni stres, ter da je antioksidantni status porušen, vendar do iztrošenosti ni prišlo in da bi bila uporaba antioksidanta vitamina E kot dodatka terapiji psov z AD smiselna.

## 7 POVZETEK

V humani medicini je v zadnjih letih precej raziskav o vlogi reaktivnih kisikovih zvrsti in oksidativnega stresa kot mediatorjev vnetnega procesa pri alergijskih obolenjih. Na področju veterinarske medicine o antioksidantnem statusu pri psih z AD v literaturi ni podatkov. Zanimalo nas je, kakšna je raven parametrov antioksidantnega statusa pri psih z AD in ali je dodajanje antioksidanta vitamina E smiselno.

Šestindvajsetim psom z AD in 17 zdravim psov smo odvzeli vzorce krvi in kože za določitev parametrov antioksidantnega statusa (glutation peroksidaza (v hemolizatu polne krvi), superoksidna dismutaza (v hemolizatu eritrocitov), celokupna antioksidantna kapaciteta (v plazmi), koncentracijo malondialdehida (v plazmi) ter vitamina E (v plazmi in koži)). Vzorce krvi smo psom z AD odvzeli pred pričetkom zdravljenja (dan vključitve) ter ob vsakem obisku v času 8-tedenskega zdravljenja (2., 4., 6. in 8. teden). Vzorce kože smo psom z AD odvzeli pred pričetkom (dan vključitve) in ob koncu zdravljenja (5. obisk). Psi z AD so bili dvojno slepo razdeljeni v dve skupini. Trinajst psov je prejelo antihistaminik *feksofenadin* v odmerku 18 mg/kg t.m. 1x dnevno in placebo v obliki mineralnega olja peroralno (placebo skupina). Skupina drugih trinajstih psov je prejela antihistaminik *feksofenadin* v odmerku 18 mg/kg t.m. 1x dnevno in antioksidant vitamin E v odmerku 8,1 IE/kg t.m. 1x dnevno peroralno (vitamin E skupina). Klinične spremembe na koži psov z AD smo v času pred pričetkom zdravljenja (dan vključitve) in v času zdravljenja (2., 4., 6. in 8. teden) ocenjevali s pomočjo CADESI-03 sistema točkovanja. Lastniki so s pomočjo vizualne analogne skale ob vsakem obisku ocenjevali stopnjo srbeža.

Izmerjene vrednosti placebo skupine smo statistično primerjali z izmerjenimi vrednostmi vitamin E skupine ter vrednosti obeh skupin z vrednostmi skupine zdravih psov. Vrednosti vitamina E v koži, vrednosti srbeža in CADESI-03 smo statistično vrednotili z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom, ostale parametre pa s parametričnim Studentovim t-testom.

Pred pričetkom zdravljenja (1. obisk) nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinama psov z AD pri nobenem od merjenih parametrov kar pomeni, da sta bili naključno izbrani skupini uravnoreženi. Pred pričetkom zdravljenja smo ugotovili statistično značilno nižjo aktivnost glutation peroksidaze (GPX) in statistično značilno večjo koncentracijo

malondialdehida (MDA) ter statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi pri obeh skupinah psov z AD v primerjavi s skupino zdravih. V začetku raziskave nismo ugotovili statistično značilnih razlik v aktivnosti superoksidne dismutaze (SOD), vrednosti celokupne antioksidantne kapacitete (TAC) in koncentraciji vitamina E v koži pri obeh skupinah psov z AD v primerjavi s skupino zdravih.

Med zdravljenjem smo že ob 2. obisku ugotovili statistično značilno višjo plazemsko koncentracijo vitamina E, statistično značilno višjo celokupno antioksidantno kapaciteto, (merjeno po metodi, ki temelji na antioksidantih, topnih v maščobah - TACBF) in statistično značilno nižjo vrednost CADESI-03 pri vitamin E skupini v primerjavi s placebo skupino, kar je vztrajalo do konca zdravljenja. Vrednosti ostalih merjenih parametrov se v času zdravljenja med skupinama psov obolelih za AD niso statistično značilno razlikovale.

Ob koncu zdravljenja (5. obisk) smo ugotovili statistično značilno nižjo koncentracijo vitamina E v plazmi psov placebo skupine v primerjavi s skupino zdravih psov, medtem ko razlika ni bila več statistično značilna med vitamin E skupino in skupino zdravih psov. Aktivnost GPX je bila ob koncu zdravljenja (5. obisk) pri obeh skupinah psov z AD še vedno statistično značilno nižja v primerjavi s skupino zdravih. Aktivnost SOD je bila statistično značilno višja pri vitamin E skupini v primerjavi s skupino zdravih psov. Koncentracija MDA je bila ob koncu zdravljenja pri placebo skupini še vedno statistično značilno višja v primerjavi s skupino zdravih psov, medtem ko statistično značilne razlike med vitamin E skupino in skupino zdravih psov ni bilo več. Ob 5. obisku nismo zasledili razlik v vrednostih TAC, TACBF in koncentracije vitamina E v koži skupin psov z AD v primerjavi s skupino zdravih.

Na osnovi vrednosti parametrov antioksidantnega statusa, koncentracije MDA in koncentracije vitamina E v plazmi in koži pred in po koncu zdravljenja sklepamo, da je oksidativni stres vključen v patogenezo AD psov in bi bila uporaba podporne terapije z vitaminom E kot antioksidantom smiselna.

## 8 SUMMARY

In the past few years there had been a number of trials on the role of oxydative stress and reactive oxygen types as mediators in inflammatory process in human alergic disease. On the contrary no literature data on antioxidant status in dogs with atopic dermatitis (AD) could have been found. We were interested on the level of parameters of antioxidant status in dogs with AD and wether adding antioxidant vitamin E would prove to be sensible.

Samples of blood and skin for determing parameters of antioxidative status (glutathione peroxidase (in hemolysate of whole blood), superoxide dismutase (in hemolysate of erythrocytes), total antioxidative capacity (in plasma), concentration of malonaldehyde (in plasma) and vitamin E (in plasma and skin), were collected from 26 dogs with AD and 17 healthy dogs. Samples of blood were collected from atopic dogs at the baseline (inclusion date) and at each visit for the duration of 8-week treatment period (2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week). Samples of skin were collected from atopic dogs at the baseline (inclusion date) and at the conclusion of the treatment period (8<sup>th</sup> week). Clinical changes of the skin of atopic dogs were assessed at the baseline (inclusion date) and for the duration of treatment period (2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week) using CADESI-03 scoring system. At each visit, owners assessed the grade of pruritus using visual-analogue scale. Dogs with AD were randomized using double-blinding into two groups. Thirteen dogs were treated with antihistamine fexofenadine in the dose of 18 mg / kg b.m. once daily and placebo in form of mineral oil peroraly (placebo group). Group of the other thirteen dogs were treated with antihistamine fexofenadine in the same dose as placebo group and antioxidant vitamin E in the dose of 8,1 IE / kg b.m. once daily peroraly (vitamin E group).

The measured levels of the placebo group were statistically compared to the measured levels of vitamin E group. Additionally, levels of both atopic groups were compared to the levels of healthy dogs. Levels of vitamin E in skin, pruritus intensities and CADESI-03 scores were statistically assessed with non-parametric Mann-Whitney test but the rest of parameters were assessed with parametric Student t-test.

At the baseline (visit 1.), we were not able to determine any significant difference between placebo group and vitamin E group. That means that selected groups were balanced. We also haven't determine statistically significant difference in activity of superoxyde dismutase (SOD), level of total antioxidative capacity (TAC) and concentration of vitamine E in the skin

of placebo and vitamin E group in comparison to the group of healthy dogs. In the same period we were able to determine statistically significant lower activity of glutathion peroxidase (GPX) and statistically significant larger concentration of malonaldehyde (MDA), as well as statistically significant lower concentration of vitamin E in plasma in both atopic groups in comparison to the group of healthy dogs.

During the treatment period, as early as at the time of the second visit, we have determined statistically significant higher plasma concentration of vitamin E, statistically significant higher total antioxidant capacity (using the method based on the fat-soluble antioxidants – TACBF) and statistically lower levels of CADESI-03 scores in the vitamin E group, compared to placebo group. These differences persisted until the conclusion of the treatment period. Levels of the rest of the measured parameters were not statistically different between the two groups of atopic dogs.

At the conclusion of the treatment period (visit 5) we determined statistically significant lower concentration of vitamin E in plasma of placebo group in comparison to the group of healthy dogs. Considering plasma vitamin E levels at the same time, the difference between vitamin E group and group of healthy dogs was no longer statistically significant. Activity of GPX was statistically significantly lower at visit 5 in both groups of atopic dogs compared to the group of healthy dogs. Activity of SOD was statistically significantly higher in vitamin E group compared to the group of healthy dogs. Concentration of MDA was statistically significantly higher in placebo group compared to the group of healthy dogs. At the same time, statistical significance between vitamin E group and group of healthy dogs was no longer existing. At visit 5 we haven't determined differences in levels of TAC, TACBF and concentration of vitamin E in the skin of atopic dogs compared to healthy dogs. Compared to visit 1, concentration of skin vitamin E in placebo group numerically decreased, whereas concentration of skin vitamin E in vitamin E group numerically increased close to the concentration of skin vitamin E in healthy dogs.

Based on the levels of antioxidative status parameters, concentration of MDA and concentration of plasma and skin vitamin E at the baseline and at the conclusion of the treatment period, we can presume involvement of oxidative stress in the pathogenesis of AD in dogs, therefore proving supportive therapy with vitamin E as an antioxidant, a sensible treatment option.

## 9 ZAHVALE

Iskrena hvala mentorici *doc. dr. Tini Kotnik* za podporo, koristne napotke pri organiziranju raziskave, vzpodbudo in pomoč pri delu. Za zaupanje in skrb.

Somentorici *doc.dr. Gabrijeli Tavčar Kalcher* za pomoč pri delu z vzorci ter hitro popravljanje osnutkov naloge.

Spoštovanima - predsedniku *prof. dr. Zlatku Pavlici* in članu komisije *prof. dr. Tomažu Lundru*, za hitro oceno doktorske disertacije.

*Hvala doc. dr. Alenki Nemeč Svete* za pomoč pri delu z vzorci in vse analize, za potrpežljivo in hitro popravljanje osnutkov naloge, za vse dragocene nasvete in čas, ki mi ga je posvetila, za skrb in usmeritve, vzpodbudo in neizmerno vero vame.

*Doc. dr. Alenki Levart* in *prof. dr. Janezu Salobirju* z Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani za izvedene analize vzorcev.

*Mateji Nagode, uni. dipl. soc.*, za opravljeno statistično analizo.

*Prof. Slavici Čergič* za lektoriranje doktorske disertacije.

*Mag. Giti Greces Smole* za pomoč pri pregledu literature.

*Karin* za pomoč pri obdelavi in analizi vzorcev.

*Gorazdu in moji Naji* za potrpežljivost in odobravanje večine mojega početja. Za brezmejno podporo in pogovore o smiselnosti za ves čas, ki sta ga preživela sama. Zato ker sta mi pokazala, da je vse mogoče in sploh zato, ker sta.

*Mami in očetu* za vso vzpodbudo ter trdno in stalno podporo iz ozadnja, še posebej v času ko sem to najbolj potrebovala.

*Tomažu* za nesebično pomoč in podporo.

*Hvala ker ste verjeli vame, kajti brez vas to delo ne bi moglo nastati.*

## 10 LITERATURA

1. Aejmelaeus RT, Holm P, Kaukinen U, Metsä-Ketelä TJA, Laippala P, Hervonen ALJ, Alho HER (1997). Age-related changes in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radic Biol Med* 23 (1): 69-75.
2. Aly DG, Shahin RS (2010). Oxidative stress in lichen planus. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 19 (1), 3-11.
3. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-22.
4. Antille C, Sorg O, Lübke J, Saurat JH (2002). Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis. *Dermatology* 204: 69-71.
5. Avellini L, Chiaradia E, Gaiti A (1999). Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp Biochem Physiol B* 123 (2): 147-54.
6. Baker H, Schor SM, Murphy BD et al. (1986). Blood vitamin and choline concentration in healthy domestic cats, dogs, and horses. *Am J Vet Res* 47 (7): 1468-71.
7. Basu AK, Marnett LJ (1983). Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 4 (3): 331-3.
8. Baud L, Ardaillou R (1993). Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 49 (3): 621-29.
9. Baz K, Burak Cimen MY, Kokturk A, Cordan Yazici A, et al. (2003). Oxidant/Antioxidant status in patients with psoriasis.

- Yonsei Med J 44: 987-90.
10. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31 (6): 1441-4.
  11. Benzie IF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biol* 239: 70-6.
  12. Bermejo P, Gomez-Serranillo SP, Santos J, Pastor E, Gil P, Martin-Aragon S (1997). Determination of malondialdehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology* 43 (4): 218-22.
  13. Bianchi G, Marchesini G, Fabbari A, Ronchi M, Chianese R, Grossi G (1997). Lipoperoxide plasma levels in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 47 (3): 784-8
  14. Bickers DR, Athar M (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126: 2565-75.
  15. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A (1994). The thioredoxin and glutaredoxin system are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 269: 29382-4.
  16. Blair IA (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp Gerontol* 36(9): 1473-81.
  17. Blum J, Fridovich I (1985). Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240 (2): 500-8.
  18. Bonness S, Bieber T (2007). Molecular basis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 382-6.

19. Bresjanac M, Črne-Finderle N, Grubič Z (1996). Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 8. izd. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 25-43.
20. Briganti S, Crisatudo A, D'Argento V, Cassano N, Turbino L, Guarrera M, Vena G, Picardo M (2001). Oxidative stress in physical urticarias. *Clin Exp Dermatol* 26: 284-8.
21. Briganti S, Picardo M (2003). Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 17: 663-9.
22. Brigelius-Flohe R, Traber MG (1999). Vitamin E: function and metabolism. *Fed Am Soc Exp Biol J* 13: 1145-55
23. Burton GW (1994). Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* 53: 251-62.
24. Bush BM (1998). Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. Oxford: Blackwell Science, 478-83.
25. Cadenas S, Rojas C, Mendez J, Herrero A, Barja G (1996). Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions. *Pharmacol Toxicol* 47 (1/3): 247-53.
26. Cao G, Prior RL (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 44 (6): 1309-15.
27. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, et al. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 15 (7): 707-19.

28. Chapple IL (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory disease.  
J Clin Periodontol 24 (5): 287-96.
29. Chio S, Tappel AL (1969). Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malondialdehyde. Biochemistry 8 (7): 2827-32.
30. Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI.  
J Biol Chem 268: 2571-6.
31. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer.  
Free Radic Biol Med 36 (12): 1481-95.
32. Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, et al. (2010). Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. Vet Med 55 (4): 163-71.
33. Darley-Usmar V, Halliwell B (1996). Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and the vascular system.  
Pharm Res 13 (5): 649-62.
34. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.  
Nutr Metabol Cardiovasc Diseases 15: 316-28.
35. Devereux G, Seaton A (2005). Diet as a risk for atopy and asthma.  
J Allergy Clin Immunol 115: 1109-17.

36. Dixon ZR, Shie FS, Warden BA, Burri BJ, Neidlinger TR (1998). The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TAB) concentrations in woman: a placebo-controlled double-blind study. *J Am Clin Nutr* 17 (1): 54-8.
37. Downing DT, Stewart ME, Strauss JS (1981). Estimation of sebum production rates in man by measurement of the squalene content of skin biopsies. *J Invest Dermatol* 77, 358-60.
38. Droge W (2002). Free radicals in the control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
39. Duthie GG (1993). Lipid peroxidation. *Eur J Clin Nutr* 47: 759-64.
40. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
41. Evans PH (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49 (3): 577-87.
42. Everett SA, Dennis MF, Patel KB, Maddix S, Kundu SC, Willson RL (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant  $\beta$ -carotene. *J Biol Chem* 271 (8): 3988-94.
43. Favrot C (2009). Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis. *Eur J Compan Anim Pract* 19 (3): 219-22.
44. Flitter WD (1993) Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull* 49 (3): 545-55.

45. Fogarty A, Lewis S, Weiss S, Britton J (2000). Dietary vitamins E, IgE concentrations, and atopy. *Lancet* 356: 1573-4.
46. Fuchs J, Zollner MT, Kaufmann R, Podda M (2001). Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radical Biol Med* 30 (4): 337-53.
47. Gallaher DD, Csallany AS, Shoeman DW, Olson JM (1993). Diabetes increases excretion of urinary malondialdehyde conjugates in rats. *Lipids* 28 (7): 663-6.
48. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 29 (11): 1106-14.
49. Gordon MH (1990). The mechanism of antioxidant action. In: Hudson BJB, eds. *Food antioxidants*. London: Elsevier Science Publishers, 1-19.
50. Goss-Sampson MA, Muller DPR, Lloyd JK (1989). Clinical importance of vitamin E: a review. *J Hum Nutr Diet* 2: 145-50.
51. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Qimica Nova* 32: 169-74.
52. Guichardant M, Valette TL, Cavadini C, Crozier G, Berger M (1994). Malondialdehyde measurements in urine. *J Chromatogr* 655: 112-6.
53. Gutteridge JMC (1994). Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91: 133-40.

54. Guyton KZ, Kensler TW (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull* 49 (3): 523-44.
55. Halliwell B, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutri* 57 (suppl): 715S-25S.
56. Halliwell B, Cross CE (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 (10): 5-12.
57. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 344 (10): 721-4.
58. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 366-408.
59. Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochemand Biophy* 280, 1-8.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1-35.
61. Halliwell B, Gutteridge JMC (2005). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 645-60.
62. Harris PL, Quaipe ML, Swanson W (1950). Vitamin E content of foods. *J Nutr* 40: 367-81.
63. Hillier A (2002). Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. *Vet med* 97 (3): 198-208.

64. Hillier A, Griffin CE (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immun Immunopathol* 81: 147-51.
65. Hosomi A, Arita M, Sato Y, et al. (1997). Affinity for  $\alpha$ -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409: 105–8.
66. Huang YL, Sheu JY, Lin TH (1999). Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem* 32 (2): 131-6.
67. Hughes DA (2001). Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* 17: 823-7.
68. Huh K, Shin US, Choi JW, Lee SI (1994). Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Arch Pharm Res* 17 (2): 109-14.
69. Imai H, Nakagawa Y (2003). Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 34: 145-69.
70. Jackson MJ, O'Farrell S (1993). Free radicals and muscle damage. *Br Med Bull* 49 (3): 630-41.
71. Jain VK, Bansal RK, Aggarwal SK, Chandhary SD, Saini AS (1988). Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma vitamin E status in patients with psoriasis. *J Dermatol* 15: 487-90.
72. Javanbakht MH, Keshavarz SA, Mirshafiey A, et al. (2010). The effects of vitamins E and D supplementation on erythrocyte superoxide dismutase and catalase in atopic dermatitis. *Iran J Public Health* 39 (1): 57-63.

73. Javanbakht MH, Keshavarz SA, Mirshafiey A, et al. (2011). Randomized controlled trial using vitamins E and D supplementation in atopic dermatitis. *J Dermatol Treat* 22 (3): 144-50.
74. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauly RD, Hall JC (2003). Glutathione. *ANZ J Surg* 73 (7): 517-22.
75. Jewell DE, Yu S, Joshi DK (2002). Effects of serum vitamin E levels on skin vitamin E levels in dogs and cats. *Vet Therap* 3 (3): 235-43.
76. Juhlin L, Edqvist LE, Ekamn LG, Ljunghall K, Olsson M (1982). Blood glutathione-peroxidase levels in skin diseases: effect of selenium and vitamin E treatment. *Acta Dermatovenerol* 62: 211-4.
77. Kadam DP, Suryakar AN, Ankush RD, et al. (2010). Role of oxidative stress in various stages of psoriasis. *Ind J Clin Biochem* 25 (4): 388-92.
78. Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31 (7): 671-701.
79. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related disease and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discovery* 3: 73-80.
80. Kinnula VL, Crapo JD (2004). Superoxide dismutase in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 36 (6): 718-44.
81. Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38: 96-109.

82. Košmelj K (2007). *Uporabna statistika*. 2. izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 48.
83. Kökçem I, Naziroğlu M (1999). Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. *Clin Chim Acta* 289: 23-31.
84. Krol ES, Kramer Stickland KA, Liebler DC (2000). Photo protective actions of topically applied vitamine E. *Drug Metab Rev* 32: 413-20.
85. Lamont J, Campbell J, Fitz-Gerald P (1997). Measurement of individual vs total antioxidants. *Clin Chem* 43: 852-4.
86. Lang JK, Gohil K, Packer L (1986). Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol, and ubiquinone in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem* 157: 106-16.
87. Leung DY, Soter NA (2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 44: S1-S12.
88. Lubec B, Hayn M, Kitzmüller E, Vierhapper H, Lubes G (1997). L-arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 22: 355-7.
89. Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95.
90. Mates JM (2000). Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* 153: 83-104.
91. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32 (2): 157-70.

92. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32 (8): 595-603.
93. Mates JM, Perez-Gomez C, Blanca M (2000). Chemical and biological activity of free radical scavengers in allergic disease. *Clin Chim Acta* 296: 1-15.
94. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, et al. (1997). Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9 (3): 461-6.
95. Meydani M (1995). Vitamin E. *Lancet* 345:170-75.
96. Misso NLA, Powers KA, Gillon RL, Stewart GA, Thompsom PJ (1996). Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 26: 838-47.
97. Miura S, Watanabe J, Sano M, Tomita I (1995). Effects of various antioxidants on the  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 18 (1): 1-4.
98. Nachbar F, Korting HC (1995). The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med* 73: 7-17.
99. Nakai K, Yoneda K, Maeda R, et al. (2009). Urinary biomarker of oxidative stress in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23: 1405-8.
100. Nemeč A, Drobnič-Košorok M, Skitek M, Pavlica Z, Galac S, Butinar J (2000). Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy Beagles. *Acta Vet Brno* 69: 297-303.

101. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003). Molondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 278 (33): 331426-33.
102. Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Terashima T, Nakamura T, Akamatsu H (2003). Protein oxidative damage in the stratum corneum: evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol* 149: 248-54.
103. Nohl H (1993). Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull* 49 (3): 653-67.
104. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakgawa Y (2000). Mitochondrial phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrom c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 351: 183-93.
105. Oh SY, Chung J, Kim MK, Kwon SO, Cho BH (2010). Antioxidant nutrient intakes and corresponding biomarkers associated with the risk of atopic dermatitis in young children. *Eur J Clin Nutr* 64: 245-52.
106. Okayama Y (2005). Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 517-9.
107. Olivry T, Guaguere E, Heripret D (1997). Treatment of canine atopic dermatitis with misoprostol, a prostaglandin E1 analogue: an open study. *J Dermatol Treat* 8: 243-47.
108. Olivry T, Dunston SM, Rivierre C (2003). A randomized controlled trial of misoprostol monotherapy for canine atopic dermatitis: effects on dermal cellularity and cutaneous tumour necrosis factor-alpha. *Vet Dermatol* 14: 37-46.

109. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R (2007). Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 18 (2): 78-86.
110. Omata N, Tsukahara H, Ito S, et al. (2001). Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69: 223-8.
111. Özben T, Nacitarhan S, Tuncer N (1995). Plasma and urine malondialdehyde levels in non-insuline-dependeni diabetic patients with and without microalbuminuria. *Int J Clin Lab Res* 25 (3): 162-4.
112. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-69.
113. Passi S, Morrone A, De Luca C, Picardo M, Ippolito F (1991). Blood levels of vitamin E, polyunsaturated fatty acids of phospholipids, lipoperoxides and glutathione peroxidase in patients affected with seborrheic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2: 171-8.
114. Pečar S (1991). Metabolizem učinkovin in radikali. *Farm Vestn* 42: 69-78.
115. Pelicano H, Carney D, Huang P (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7 (2): 97-110.
116. Pesillo SA, Freeman LM, Rush JE (2004). Ass essment of lipid peroxidation and serum vitamin E concentration in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Am J Vet Res* 65 (12): 1621-4.
117. Plevnik Kapun A, Salobir J, Levart A, Kotnik T, Nemeč Svete A (2012). Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 92: 469-70.

118. Poli G (1993). Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull* 49 (3): 604-20.
119. Polla BS, Ezekowitz RA, Leung DY (1992). Monocytes from patients with atopic dermatitis are primed for superoxide production. *J Allergy Clin Immunol* 89: 545-51.
120. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R (2007). Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomed Pharmacol* 61: 412-22.
121. Prior RL, Cao G (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol Med* 27: 1173-81.
122. Psotova J, Zahalkova J, Hrbač J, Šimanek V, Bartek J (2001). Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry: two case reports. *Biomed Papers* 145 (2): 81-3.
123. Raho G, Cassano N, D'Argento V, Vena AG, Zanotti F (2003). Over-expression of Mn-superoxide dismutase as a marker of oxidative stress in lesional skin of chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Dermatol* 28 (3): 318-20.
124. Ray G, Husain SA (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 40 (11): 1213-32
125. Rezar V, Frankič T, Narat N, Levart A, Salobir J (2010). Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult Sci* 86: 1155-60.

126. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (1991). Techniques in free radical research. In: Burton RH, Knippenberg PH, eds. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier, 291.
127. Rice-Evans CA (1994). Formation of free radicals and its control. In: Rice-Evans CA, Burton RH, eds. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier Science, 131-53.
128. Richelle M, Sabatier M, Steiling H, Williamson G (2006). Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Br J Nutr* 96: 227-38.
129. Roosje P (2005). Canine atopic dermatitis: new concept. *Eur J Companion Anim Pract* 15 (2): 189-95.
130. Rosa C, Blake, JE, Mazzaro L, Hoekstra P, Ylitalo GM, O'Hara TM (2007). Vitamin A and E distribution with comparisons to organochlorine concentrations in the serum, blubber and liver of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). *Comp Biochem Physiol B* 148: 454-62.
131. Rowe A, Farrell AM, Bunker CB (1997). Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 136: 18-23.
132. Ryrfeldt Å, Bannenberg G, Moldèus P (1993). Free radicals and lung disease. *Br Med Bull* 49 (3): 588-603.
133. Salobir J, Pajk Žontar T, Levart A, Rezar V (2010). The comparison of black currant juice and vitamin E for the prevention of oxidative stress. *Int J Vitam Nutr Res* 80: 5-11.

134. Sano M, Ernesto C, Thomas RG, et al. (1997). A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or boath as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N Engl J Med* 336: 1216-22.
135. Sato R, Inanami O, Syuto B, Sato J, Kuwabara M, Naito Y (2003). The plasma superoxide scavenging activity in canine cancer and hepatic disease. *J Vet Med Sci* 65 (4): 465-9.
136. Serafini M, Del Rio D (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 9 (3): 145-51.
137. Severin E, Nave B, Ständet M, Ott R, Traupe H (1999). Total antioxidative capacity is normal in sera from psoriasis patients despite elevated bilirubin, tocopherol and urate levels. *Dermatology* 198: 336-9.
138. Sezer E, Ozugurlu F, Ozyurt H, Sahin S, Etikan I (2007). Lipid peroxidation and antioxidant status in lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 32: 430-4.
139. Shamberger RJ, Andreone TL, Willis CE (1974). Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malondialdehyde as a carcinogen. *J Natl Cancer Inst* 53 (6): 1771-3.
140. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L (1994). Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102: 122-4.
141. Simsek S, Yüce A, Ütük AE (2006). Determination of serum malondialdehyde levels in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Firat Univ Saglik Bilimleri Vet Dergisi* 20 (3): 217-20.

142. Souci SW, Fachmann W, Kraut H (2008). Food composition and nutrition tables. 7<sup>th</sup> ed. Stuttgart: Medipharm Scientific Publishers, 293-774.
143. Sousa CA (1988). Atopic dermatitis. *Vet Clin N Am Small Anim Pract* 18: 1049-59.
144. Spiteri MA, Bianco A, Strange RC, Freyer AA (2000). Polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation. *Allergy* 55: 15–20.
145. Stein D (2000). Natural healing for dogs and cats. Freedom: Crossing Press, 57.
146. Stohs SJ (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 6 (3/4): 205-28.
147. Stratton SP, Liebler DC (1997). Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. *Biochemistry* 36: 12911-20.
148. Sun Y (1990). Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 8 (6): 583-99.
149. Šabovič M (2004). Umanjšanje oksidativnega stresa v arterijski steni: nova možnost za preprečevanje in zdravljenje ateroskleroze. In: 6. Fajdigovi dnevi. Kranjska Gora, 2004. Ljubljana: Združenje zdravnikov družinske medicine SZD, 61-5.
150. Štalcer B, Ploj T (1993). Kisikovi prosti radikali: nastanek, reakcije in pomen v organizmu. *Med Razgl* 32: 403-25.
151. Tarpataki N, Papa K, eiczigel J, Vajdovich P, Vörös K (2006). Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Vet Hung* 54 (3): 353-66.

152. Thiele JJ (2001). Oxidative targets in stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14 (suppl 1): 87-91.
153. Thiele JJ, Ekanayake Mudiyansele S (2007). Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med* 28: 646-67.
154. Thiele JJ, Traber MG, Packer L (1998). Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol* 110: 756-61.
155. Thiele JJ, Weber SU, Packer L (1999). Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 113: 1006-10.
156. Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D, Gadjeva V (2005). Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Path* 13: 90-4.
157. Traber MG (1997). Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner Electrolyte Metab* 23: 135-9.
158. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR (2002). Oxidative stress in its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* 4: 665-73.
159. Tsourelis Nikita E, Hercogova J, Lotti T, Menchini G (2002). Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of immunoglobulin E serum levels. *Int J Dermatol* (41): 146-50.

160. Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, Takeuchi M, Ochi H (1998). 8-hidroxydeoxyguanosine in urine as an indeks of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 138 (6): 1033.
161. Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki et al. (2003). Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 72: 2509-16.
162. Utas S, Kose K, Yazici C, Akdas A, Kelestimur F (2002). Antioxidant potential of propylthiouracil in patients with psoriasis. *Clin Biochem* 35: 241-6.
163. Vajdovich P (2001). Measurements of oxidative stress. *Vet Clin Patol* 30; 158.
164. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telseer J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1): 44-84.
165. Vaule H, Leonard SW, Traber MG (2004). Vitamin E delivery to human skin: studies using deuterated  $\alpha$ -tocopherol measured by APCI LC-MS. *Free Radic Biol Med* 36: 456–63.
166. Willemse A (1986). Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract* 27: 771-8.
167. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, et al. (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 34: 159-87.
168. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR (1993). Free radicals in inflammation: second meditators of tissue destruction. In *Br Med Bull* 49 (3): 506-22.

169. Wolff SP (1993). Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 49 (3): 642-62.
170. Wolf R, Wolf D, Ruocco V (1998). Vitamin E: the radical protector. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 10: 103-117.
171. Yau TM (1979). Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells. *Mech Ageing Dev* 11:137-44.

## 11 PRILOGE

## 11.1 Priloga 1: Anamnestični podatki

Tabela 6 : Anamnestični podatki za skupino placebo.

ŠTEVILKA PSA/ANAMNESTIČNI PODATKI	1	2	3	4	5	6	9	13	14	15	18	19	27	29
BIVALNO OKOLJE	R	R	R	R	R	R	U/R	R	R	R	R	R	R/U	R/U
ŽIVI V STANOV./ ZUNAJ	St/Z	St/Z	Z	St/Z	St	St	St	St	St	St/Z	St	St/Z	St	St
STAROST OB POJAVU PRVIH BOLEZENSKIH ZNAKOV	2L	6m	3L	2L	6m	1L	10 m	2L	1L	6m	6m	6m	3L	6m
DRUŽINSKA PREDISPOZICIJA	-	-	-	?	-	+	-	+	+	?	-	-	?	-
DRUGE ŽIVALI DOMA	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
OBOLEVNOST DRUGIH ŽIVALI ALI LJUDI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PREDHODNA ZDRAVLJENJA	Atb /T/ Em k	Atb /M/ Em k	Atb /T	M	T/E mk	Em k	M/ T/E mk	M/ T/E mk	T	T/E mk	T/E mk	T	Atb	Atb /T/ Em k
MOTNJE V GONITVI / LIBIDU	NE	Ster il	NE	Ster il	NE	NE	NE	NE	NE	Ster il	NE	NE	NE	Kas tr
VAKC./DEHELMINTIZAC..	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r
APETIT/ŽEJA	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
GASTROINTEST. MOTNJE	NE	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE	NE	DA
RESPIRATORNE MOTNJE	NE	NE	NE	NE	DA	NE	NE	DA	NE	NE	NE	NE	DA	NE
SEZON./NESEZON. SIMPTOMI	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS

LEGENDA: ?-neznano, R-ruralno okolje, U-urbano okolje, P-pes, Pa-papagaj, Ma-mačka, Z-zajec, M-medrol, m- mesec, L- leto, T-topikalna terapija, Atb-antibiotiki, K-kapljice za ušesa, D-dieta, Emk-esencialne maščobne kisline, AM-antimikotiki, St-stanovanje, Z-zunaj, r-redno, nr-neredno, N- normalen, ↑-povišan, ↓-zmanjšan, NS- nesezonski, S-sezonski, Steril.-sterilizirana, Kast.-kastiran

Tabela 7: Anamnestični podatki za skupino vitamin E.

ANAMNESTIČNI PODATKI; SKUPINA 2	7	8	10	11	12	16	17	20	21	22	23	24	25	26	28
<b>BIVALNO OKOLJE</b>	R	R	R	R	R/U	R/U	R	R/U	R	R	R	R	R/U	R	R
<b>ŽIVI V STANOV./ ZUNAJ</b>	St	St	Z	St	St	St	St/Z	St	St	St	St	Z	St	St	St/Z
<b>STAROST OB POJAVU PRVIH BOLEZENSKIH ZNAKOV</b>	6m	3L	2L	6m	1L	1L	2,5 L	2L	2L	2,5 L	6m	3m	6m	1,5L	8m
<b>DRUŽINSKA PREDISPOZICIJA</b>	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-
<b>DRUGE ŽIVALI DOMA</b>	-	-	+(Ma)	-	-	-	+(Pa)	-	+(Pa)	+(Ma)	-	+(P,Ma)	-	+(Ma)	+(Ma)
<b>OBOLEVNOST DRUGIH ŽIVALI ALI LJUDI</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>PREDHODNA ZDRAVLJENJA</b>	D/T	T/Emk	Atb/T/Emk	T/Emk	Emk	T	Atb/Emk	Atb/M/Emk	T	-	T	Atb/T/M/Emk	M/Atb/T	M/T	Emk
<b>MOTNJE V GONITVI / LIBIDU</b>	-	-	-	-	-	Ster	Kast	-	Kast	Ster	Kast	-	Steril.	Kast	Ster
<b>VAKC./DEHELMINT.</b>	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r	r/r
<b>APETIT/ŽEJA</b>	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
<b>GASTROINTEST. MOTNJE</b>	NE	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>RESPIRATORNE MOTNJE</b>	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	DA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>SEZON./NESEZON. SIMPTOMI</b>	NS	NS	S	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS

LEGENDA: ?-neznano, R-ruralno okolje, U-urbano okolje, P-pes, Pa-papagaj, Ma-mačka, Z-zajec, M-medrol, m- mesec, L- leto, T-topikalna terapija, Atb-antibiotiki, K-kapljice za ušesa, D-dieta, Emk-esencialne maščobne kisline, AM-antimikotiki, St-stanovanje, Z-zunaj, r-redno, nr-neredno, N- normalen, ↑-povišan, ↓-zmanjšán, NS- nesezonski, S-sezonski, Steril.-sterilizirana, Kast.-kastriran

## 11.2 Priloga 2: Vključitveni kriteriji po Willemse-ju

Tabela 8: Kriteriji po Willemse-ju za skupino placebo.

<b>KRITERIJI PO WILLEMSE-ju; SKUPINA 1</b>		1	2	3	4	5	6	9	13	14	15	18	19	27	29
1	<b>SRBEŽ</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<b>LOKACIJA SPREMEMB</b>  -NA GLAVI (cheilitis ali eritem notranjega dela ušesa)  IN/ALI NOG (obojestranski kranialni pododermatitis)  - LIHENIFIKACIJA UPOGIBNEGA DELA KOLENSKEGA SKLEPA IN/ALI UPOGIBNEGA DELA KARPALNEGA SKLEPA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	<b>KRONIČNI ALI PONAVLJAJOČI SE DERMATITIS</b>	X		X	X	X		X		X	X	X	X	X	
4	<b>ZNANA PASEMSKA ALI DRUŽINSKA PREDISPOZICIJA</b>		X		X		X		X						X
1	<b>POZITIVNI INTRADERMALNI TEST</b>	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<b>PRVI ZNAKI MED 6m IN 32m STAROSTI</b>		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	<b>BILATERALNI KONJUNKTIVITIS</b>	X													
4	<b>POVRŠINSKO GNOJNO VNETJE KOŽE</b>							X							
5	<b>ERITEM OBRAZA</b>					X									
6	<b>HIPERHIDROZA</b>														

Tabela 9: Kriteriji po Willemse-ju za skupino vitamin E.

KRITERIJI PO WILLEMSE-ju; SKUPINA 2		7	8	10	11	12	16	17	20	21	22	23	24	25	26	28
<b>GLAVNI KRITERIJI</b>																
1	<b>SRBEŽ</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	<b>LOKACIJA SPREMEMB</b>  -NA GLAVI (chelitis ali eritem notranjega dela ušesa)  IN/ALI NOG (obojestranski kranialni pododermatitis)  - LIHENIFIKACIJA UPOGIBNEGA DELA KOLENSKEGA SKLEPA IN/ALI UPOGIBNEGA DELA KARPALNEGA SKLEPA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	<b>KRONIČNI ALI PONAVLJAJOČI SE DERMATITIS</b>		X		X	X	X	X	X	X	X			X		
4	<b>ZNANA PASEMSKA ALI DRUŽINSKA PREDISPOZICIJA</b>	X	X	X								X	X		X	X
<b>MANJŠI KRITERIJI</b>																
1	<b>POZITIVNI INTRADERMALNI TEST</b>	X	X		X			X				X	X	X	X	X
2	<b>PRVI ZNAKI MED 6m IN 32m STAROSTI</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	<b>BILATERALNI KONJUNKTIVITIS</b>					X			X					X		
4	<b>POVRŠINSKO GNOJNO VNETJE KOŽE</b>		X							X	X					
5	<b>ERITEM OBRAZA</b>			X												
6	<b>HIPERHIDROZA</b>						X									

### 11.3 Priloga 3: Prehrana psov z atopičnim dermatitisom

Tabela 10: Prehrana psov z atopičnim dermatitisom in vsebnost vitamina E

mg tokoferola/kg vzorca	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ -tokoferol	$\gamma$ -tokoferol	$\delta$ -tokoferol
Kuhano konjsko meso	6,67	/	/	/
Kuhani ovseni kosmiči	2,67	/	/	/
Kuhana prosena kaša	/	/	6,90	1,40
Kuhan oslič	8,69	/	1,47	/

### 11.4 Priloga 4: Prehrana zdravih psov

Tabela 11: Prehrana zdravih psov in vsebnost vitamina E

SKUPINA ZDRAVIH PSOV		1*	2	3	4*	5*	6*	7	8	9	10	11	12*	13*	14	15*	16	17
<b>PREHRANA/VSEBNOST VITAMINA E</b>																		
1	<b>DOMA KUHANNA PREHRANA (mg/kg)</b>																	
	GOVEJE MESO 2,2	X	X	X	X								X		X			
	KURJE MESO 1,9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	
	OSLIČ 8,2																	X
	KONJSKO MESO 6,7																	X
	TESTENINE 12	X	X	X			X		X	X	X		X		X	X	X	
	POLENTA 2	X	X		X		X		X									X
	RIŽ 3,5	X	X		X				X	X			X	X	X	X	X	
	KORENJE 3,5					X									X			
	KROMPIR 0,5					X									X			
2	<b>BRIKET I( mg/kg)</b>																	
	FRISKIES 80												X					
	FROLIC 80	X				X												

Plevnik Kapun A. Vpliv vitamina E na oksidativni stres pri psih z atopičnim dermatitisom

	MERKATOR	50					X			X							
	MIGLIOR CANE	50							X								
	CHAPI	40		X													
	DARLING	0					X										
	PEDIGRE PAL	160			X			X									
	EUCANUBA	200								X						X	X
	HILL'S CHICKEN MENTENANCE	600									X			X			
3	<b>KONZERVE (mg/kg)</b>																
	MERKATOR	5				X											
	MIGLIOR CANE	5							X								
	DARLING	10					X										

\*briketi kot priboljšek (ena pest na dan)

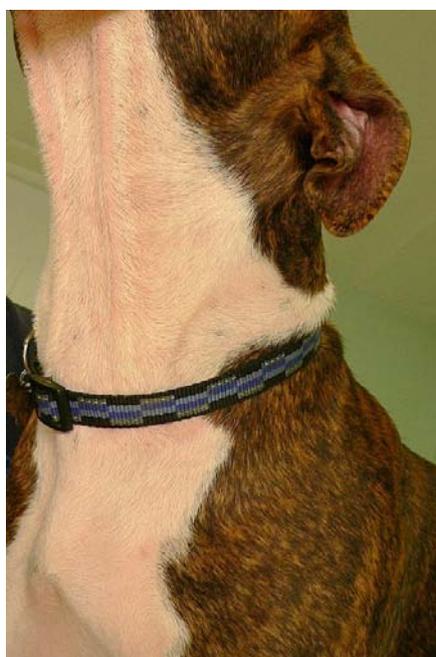
### 11.5 Priloga 5: Fototabela



*Slika 2: Eritem šape 1. stopnje*



*Slika 3: Eritem šape 2. stopnje*



*Slika 4: Eritem vratu 3. stopnje*



*Slika 5: Eritem glave 4. stopnje*



*Slika 6: Eritem ušesa 5. stopnje*



*Slika 7: Lihenifikacija ušesa 1. stopnje*



*Slika 8: Lihenifikacija perineuma in vulve 2. stopnje*



*Slika 9: Lihenifikacija trebuha 3. stopnje*



*Slika 10: Lihenifikacija vratu 4. stopnje*



*Slika 11: Lihenifikacija ingvinalnega področja 5. stopnje*



*Slika 12: Exskoriacija trebuha 1. stopnje*



*Slika 13: Exskoriacija komolca 2. stopnje*



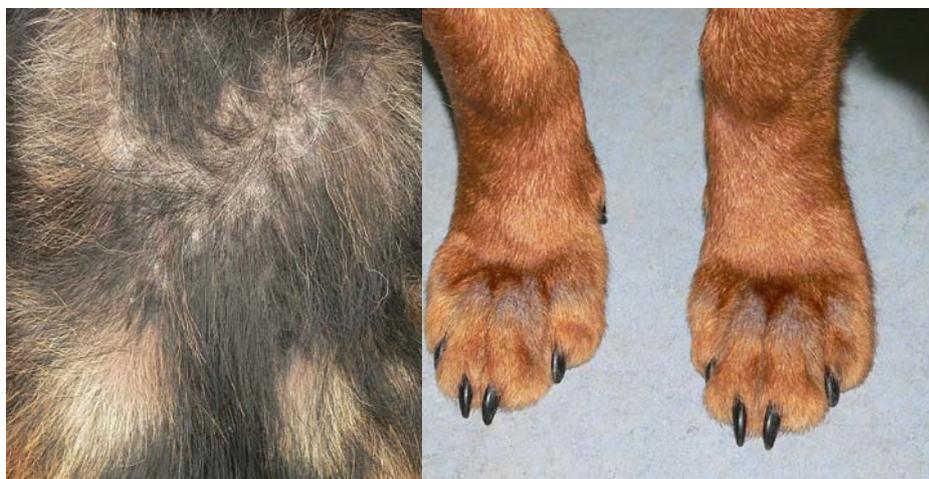
*Slika 14: Exskoriacija glave 3. stopnje*



*Slika 15: Exskoriacija hrbta 4. stopnje*



*Slika 16: Ekskoriacija zadnje noge 5. stopnje*



*Slika 17: Alopecija hrbta 1. stopnje*

*Slika 18: Alopecija nog 2. stopnje*



*Slika 19: Alopecija hrbta 3. stopnje*

*Slika 20: Periokularna alopecija 4. stopnje*



*Slika 21: Alopecija prednjih nog 5. stopnje*

## 11.6 Priloga 6: Numerična skala za oceno srbeža

Tabela 12: Numerična skala za oceno srbeža

Skala	Kategorija	Opis
0	Brez srbeža	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje v normalnih mejah
1	Blag srbež	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje bolj izraženo kot normalno, vendar ne vpliva na dnevne aktivnosti kot npr. hranjenje, igranje
2	Blag do zmeren srbež	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje bolj pogosto, ampak generalno ne vpliva na dnevne aktivnosti
3	Zmeren srbež	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje vpliva na dnevne aktivnosti
4	Zmeren do hud srbež	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje, močno vpliva na dnevne aktivnosti in/ali moti normalno spanje psa
5	Hud srbež	Praskanje, grizenje, drsanje ob predmete in lizanje izraženo skozi ves dan in/ali ponoči

## 11.7 Priloga 7: Rezultati alergijskega testiranja

Tabela 13 : Rezultati alergijskega testiranja za skupino placebo.

	ANTIGENI	1	2	3	4	5	6	9	13	14	15	18*	19	27	29
1	negativna kontrola														
2	pozitivna kontrola														
3	mešanica pelodov trav														
4	Housedust (hišni prah)												+++		
5	mešanica pelodov dreves I. (breza, jelša, leska)													++	
6	mešanica pelodov dreves II. (hrast, bukev, brest)													+	
7	mešanica pelodov plevelov (kopriva, regrat)													+	
8	Tyrophagus putrescentiae (pršica)	+++	+++	+++	+		++	+++	+++		+++			+	+++
9	Dermatophagoides farinae (pršica)	+++		+++	++		++	+++			+++		+		+++
10	Lepidoglyphus destructor (pršica)	++	++	+++				++	+++		+++				++
11	Dermatophagoides pteronyssinus (pršica)		+++						+++	++	+		+++		++
12	Acarus siro (pršica)	++	+++	+++	+++		++	+++	+++		+++			+	+++





Tabela 14: Rezultati alergijskega testiranja za skupino vitamin E.

ANTIGENI	7	8	10*	11	12*	16	17	20*	21*	22	23	24*	25	26	28
1 negativna kontrola															
2 pozitivna kontrola															
3 mešanica pelodov trav										+					
4 Housedust (hišni prah)						+	+++								
5 mešanica pelodov dreves I. (breza, jelša, leska)				++		++									
6 mešanica pelodov dreves II. (hrast, bukev, brest)															+
7 mešanica pelodov plevelov (kopriva, regrat)				++											
8 Tyrophagus putrescentiae (pršica)	+++	++		++			++				+++		+++	+++	++
9 Dermatophagoides farinae (pršica)	+++	+++		+++			+++				+++		++	+++	++
10 Lepidoglyphus destructor (pršica)	+++			++							+++		+++	++	++
11 Drematophagoides pteronyssinus (pršica)	+++						+++						+		
12 Acarus siro (pršica)	+++	++	++				+				+++		+++	++	++
13 Euroglyphus maynei (prehranska pršica)	+++						+				++				
14 pasji epitel													+		+
15 test Flea (boljšja slina)															
16 Apergilus mix															



	(kostanj)																		
37	Olea europea (oliva)																		+
38	Pinus sylvestris (bor)																		+
39	Platanus occidentalis (platana)																		+
40	Robinia pseudoacacia (akacija)																		+
41	Cladosporium cladosporides (plesen)																		+
42	Columba palumpus (golobji epitel)	++																	++
43	Psittacus spp. (epitel papige)	++	+																++
44	Serenus canaris (epitel kanarčka)	++	+																
45	Cricetus cricetus (epitel hrčka)	+	+																+
46	Oryctolagus caniculus (epitel kunca)																		+
47	Cockroach (ščurek)	++																	
48	Ades communis (komar)																		++
49	Hous fly (hišna muha)																		

LEGENDA: + blaga reakcija na koži, ++ srednje močna reakcija na koži, +++ zelo močna reakcija na koži, \*negativni untradermalni testi, •opravljene meritve IgE

Tabela 15: Rezultati IgE testiranja

	ANTIGENI	20	24
1	Mix trav 1(Lolium, Phleum, Dactylis, Poa, Festuca)	++	++
2	Mix trav2 (Cynodon, Agrostis, Agropyron, Holcus)	++	++
3	Mix trav 3 (Zea, Triticum, Avena, Hordeum, Secale)	++	++
4	Chaenopodium album	++	+ -
5	Ambrosia elatior	++	++
6	Mix dreves (Betula, Corylus, Alnus)	++	+ -
7	Ligustrum vulgare	++	-
8	Dermatophagoides pteronyssinus	-	++
9	Dermatophagoides farinae	-	++++
10	Acarus siro	-	++
11	Tyrophagus putrescentiae	-	++