

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.7.09:616.5–002–076:544.146.5:577.16.3:615.218(043.2)

**VREDNOTENJE VPLIVA OKSIDATIVNEGA STRESA NA
KLINIČNE PARAMETRE PSOV Z ATOPIČNIM
DERMATITISOM MED ZDRAVLJENJEM S
FEKSOFENADINOM IN VITAMINOM E NA PODLAGI
IMUNOHISTOKEMIČNEGA DOLOČANJA
3-NITROTIROZINA V BIOPTIH KOŽE**

**EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS INFLUENCE ON
CLINICAL PARAMETERS OF DOGS WITH ATOPIC
DERMATITIS DURING TREATMENT WITH
FEXOFENADINE AND VITAMINE E BASED ON
IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF 3–
NITROTYROSINE IN SKIN BIOPSIES**

Metka Zarnik

Urša Lamprecht

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom doc. dr. Tine Kotnik in somentorstvom prof. dr. Gregorja Majdiča na Veterinarski fakulteti v Ljubljani

Ljubljana, 2013

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Pes, bolezni; dermatitis, atopični – zdravljenje z zdravili; oksidativni stres; antioksidanti – terapevtska raba; vitamin E; biopsija; koža – citologija; imunohistokemija; psi

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali vitamin E kot antioksidant vpliva na zmanjšanje kliničnih, citoloških in imunohistokemičnih parametrov oksidativnega stresa pri psih z atopičnim dermatitisom (AD) in ali je uporaba vitamina E učinkovita in smiselna pri zdravljenju AD pri psih. V raziskavo je bilo vključenih devetindvajset psov z diagnozo AD in sedemnajst zdravih psov. Med raziskavo so bili na željo lastnikov izključeni tri psi z AD. Psi z AD so bili dvojno slepo razdeljeni v dve skupini. Trinajst psov je prejemalo antihistaminik *feksofenadin* in placebo v obliki mineralnega olja peroralno. Skupina drugih trinajstih psov je prejemala antihistaminik *feksofenadin* in antioksidant vitamin E. V obdobju osmih tednov smo petkrat ocenjevali klinične spremembe na koži psov in srbež. Pri vsakem obisku smo odvzeli tudi ostružke in brise kože telesa in sluhovodov za citološko preiskavo. Biote za imunohistokemično določanje trinitrotirozina (3-NT) in inducibilne sintaze dušikovega oksida (iNOS) smo odvzeli pri prvem in pri zadnjem obisku. Rezultati naše raziskave so pokazali statistično značilno manjšo stopnjo srbeža med zdravljenjem v primerjavi s stopnjo srbeža pred zdravljenjem pri obeh skupinah psov. Ti so bili posledica zdravljenja psov z antihistaminikom feksofenadinom in ne zdravljenja z vitaminom E. Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov pred in med zdravljenjem smo ugotovili trend proti statistični zanesljivosti, ki se je pokazal v manjšem obsegu kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo. Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov med zdravljenjem pa je bil obseg kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E značilno manjši od obsega kliničnih znakov pri psih, zdravljenih s placebo. Med obema skupinama psov (vitamin E in placebo) smo ugotovili rahla nihanja v številu kokov in kvasovk, vendar niso bila statistično značilna. Zdravljenje AD z vitaminom E ni imelo vpliva na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemičnoobarvanega 3-NT. Razlik med spoloma pri zdravljenju z vitaminom E nismo ugotovili. Z raziskavo smo ovrgli hipotezo, da ima zdravljenje AD z vitaminom E vpliv na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemičnoobarvanega 3-NT. Hipotezo, da je uporaba vitamina E smiselna pri zdravljenju AD pri psih,

smo deloma potrdili, deloma ovrgli, saj ima zdravljenje z vitaminom E vpliv na izboljševanje kliničnih znakov psov z AD, vendar pa ne vpliva na izboljševanje stopnje srbeža in število kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov psov.

SUMMARY

KEY WORDS: Dog diseases; dermatitis, atopic – drug therapy; oxidative stress; antioxidants – therapeutic use; vitamin E; biopsy; skin – cytology; immunohistochemistry; dogs

The purpose of this study was to determine the possible influence of vitamine E as an antioxidant in reducing clinical, citological and immunohistochemical parameters of oxidative stress in dogs with atopic dermatitis (AD) and to establish whether the use of vitamin E is effective as additional treatment of AD in dogs. Twentynine dogs with AD and seventeen healthy dogs were included in this study. Based on owners request three dogs were excluded from the study. Dogs with AD were grouped by double-blinding into two groups. Thirteen dogs received antihistamine fexofenadine and placebo in a form of mineral oil peroraly. The other group of thirteen dogs received antihistamine fexofenadine and antioxidant vitamin E. Clinical changes and pruritus were assessed during the period of 8 weeks. During each visit skin scrapings and skin swabs for parasitological and cytological examinations were collected. Skin samples of atopic dogs were collected at the beggining (inclusion date) and at the end of the treatment period for immunohistochemical determination of 3-nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase (iNOS). The statistical results of our study have shown significant reduction of pruritus during treatment in both AD groups, suggesting that this was effect of antihistamine fexofenadine and not of vitamin E. Improvement of clinical signs was significantly better in group treated with vitamin E in comparison to group treated with placebo, suggesting beneficial effect of vitamine E. Number of cocci and yeast slightly varied in both groups (placebo and vitamin E) but was not statistically significantly different between groups. Similarly, there was no effect of treatment on intensity of 3-nitrotyrosin imunohistochemical staining. There were no noticeable differences between sexes when treating with vitamin E. In conclusion, our study disproved the hypothesis that vitamin E treatment of AD influences expression of inducable nitric oxide synthase as monitored by immunohistochemical staining of 3-nitrotyrosine. The hypothesis that the use of vitamin E in dogs with AD is beneficial has been partly proved as the treatment with vitamin E improved clinical signs, but did not reduce the pruritus, number of cocci or yeast on skin of abdomen and skin of ear canals in dogs in comparison to placebo group.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	ii
SUMMARY	iv
KAZALO VSEBINE.....	v
KAZALO DIAGRAMOV	viii
KAZALO TABEL.....	viii
KAZALO SLIK.....	viii
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	ix
1. UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA.....	3
1.3. DELOVNE HIPOTEZE	3
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1 Atopični dermatitis	4
2.2 Vloga kože.....	4
2.3 Kožna pregrada.....	6
2.4 Zgradba in delovanje kožne pregrade.....	6
2.5 Oslabljeno delovanje kožne pregrade	8
2.6 Oslabljeno delovanje kožne pregrade pri ljudeh in psih z AD	8
2.7 Ocenjevanje delovanja kožne pregrade	9
2.8 TEWL pri ljudeh z AD	10
2.9 Vloga mutacije genov pri patogenezi AD	10
2.10 Filagrin	10
2.11 Vloga filagrina pri miših.....	12
2.12 Vpliv mutacije genov na razvoj vnetne reakcije kože.....	12
2.13 Alergijska reakcija.....	13

2.14 Vpliv delovanja citokinov Th2 na zmanjšano diferenciacijo keratinocitov in zmanjšano izraženost filagrina	14
2.15 Srbež v patogenezi AD	15
2.16 Vloga oksidativnega stresa pri AD	17
2.17 Oksidativni stres pri ljudeh z AD	18
2.18 Nastanek oksidativnega stresa	18
2.19 Reaktivne kisikove in dušikove zvrsti	19
2.20 Lipidna peroksidacija	20
2.21 Atopični dermatitis in iNOS	21
2.22 iNOS pri ljudeh.....	22
2.23 Nitracija tirozina	22
2.24 3 - nitrotirozin.....	23
2.25 Antioksidanti in antioksidativno delovanje	24
2.26 Vitamin E in njegovo delovanje	25
2.27 Delovanje vitamina E pri ljudeh.....	26
2.28 Merjenje vsebnosti vitamina E	26
2.29 CADESI.....	28
2.30 Dosedanji pristopi k zdravljenju AD	28
3. MATERIAL IN METODE	32
3.1 Živali, vključene v raziskavo.....	32
3.2 Uporabljena zdravila.....	32
3.3 Merjeni parametri živali, vključenih v študijo.....	32
3.4 Sistem vrednotenja kliničnih znakov CADESI-03.....	33
3.5 Ocenjevanje stopnje srbeža	33
3.6 Citološka preiskava ostružkov in brisov kože telesa in sluhovodov	34
3.7 Imunohistokemična preiskava	35

3.8 Statistična obdelava podatkov	39
4. REZULTATI.....	40
4.1 Stopnja srbeža.....	42
4.2 Obseg kliničnih znakov	43
4.3 Število kokov.....	45
4.4 Število kvasovk	47
4.5 Stopnja obarvanja 3 – NT z imunohistokemično metodo	51
4.6 Stopnja obarvanja iNOS z imunohistokemično metodo	53
5. RAZPRAVA	54
5.1 Stopnja srbeža.....	54
5.2 Obseg kliničnih znakov	55
5.3 Število kokov in kvasovk na koži psov z atopičnem dermatitisom.....	57
5.4 Imunohistokemično barvanje	58
5.5 Vpliv spola na vpliv zdravljenja AD z vitaminom E	60
6. SKLEPI.....	61
7. POVZETEK	62
8. ZAHVALA	64
9. LITERATURA.....	65

KAZALO DIAGRAMOV

Diagram 1: Primerjava povprečne stopnje srbeža po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E.....	42
Diagram 2: Primerjava povprečnega obsega kliničnih znakov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E	43
Diagram 3: Primerjava povprečnega števila kokov na koži trebuha psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E	45
Diagram 4: Primerjava povprečnega števila kokov v sluhovodih psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E	46
Diagram 5: Primerjava povprečnega števila kvasovk na koži trebuha psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E	47
Diagram 6: Primerjava povprečnega števila kvasovk v sluhovodih psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E	48
Diagram 7: Primerjava stopnje obarvanja 3 - NT z IHC po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in ob koncu zdravljenja (odvzem 4) s placebom in vitaminom E.....	52

KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam psov vključenih v raziskavo.....	41
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Kvasovke s kože sluhovoda	49
Slika 2: Koki s kože trebuha.....	50
Slika 3: Različne kvalitativno ocnjene stopnje imunohistokemičnega obarvanega 3 - NT v epiteliju kože.....	51
Slika 4: Imunohistokemično obarvan iNOS v epiteliju kože	53

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AD	Atopični dermatitis
APC	Antigen predstavitevne celice
DNP	Dinitrofenilhidrazon
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
CADESI – 03	angl., Canine Atopic Dermatitis Extent Severity Index
CAT	Katalaza
CCE	Poroženel celični ovoj
CCL 5	Kemokini ligand 5
CCL 17	Kemokini ligand 17
CCL 22	Kemokini ligand 22
CCL 27	Kemokini ligand 27
DC	Dendritične celice
dDC	Dermalne dendritične celice
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
EDC	Epidermalni diferenciacijski kompleks
GM – CSF	Spodbujajoči dejavnik za kolonije granulocitov
GPX	Glutationska peroksidaza
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
HOCl	Hipoklorna kislina
IDEC	Vnetne dendritične epidermalne celice
IL – 1	Interlevkin 1

IL – 1a	Interlevkin 1a
IL – 1b	Interlevkin 1b
IL – 4	Interlevkin 4
IL – 5	Interlevkin 5
IL – 13	Interlevkin13
IL – 18	Interlevkin 18
IL – 22	Interlevkin 22
IL – 31	Interlevkin 31
IL – IRA	Receptor antagonista interlevkin 1
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovega oksida
ITFCAD	Mednarodna delovna skupina za atopični dermatitis psov
LC	Langerhansove celice
MDA	Malondialdehid
NAD(P)H	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat
NMF	Naravni dejavniki vlage
NO•	Dušikov oksid
NOS	Sintaza dušikovega oksida
3 – NT	Trinitrotirozin
$^1\text{O}_2$	Singletni kisik
$\text{O}_2\cdot$	Superoksidni radikal
OH^\cdot	Hidroksilni radikal
OH_2^\cdot	Hidroperoksidni radikal
OONO^-	Peroksinitrit

OS	Oksidativni stres
RNS	Reaktivne dušikove zvrsti
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti
SCORAD	angl., SCORing Atopic Dermatitis
SOD	superoksidna dismutaza
TEWL	Prekokožna izguba vode
TNF – α	Tumorje nekrotizirajoči faktor alfa

1. UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Koža je organ, ki prekriva in ščiti telo. Ima mnogo funkcij (Scott in sod., 2001, Darlenski in sod., 2009), predvsem pa predstavlja pregrado, ki preprečuje prekomerno izgubo vode in elektrolitov iz organizma, ter hkrati preprečuje vstopanje snovem iz okolja (Tsuruta in sod., 2002, Feingold in Denda, 2012). Njeno delovanje lahko oslabijo številni notranji in zunanji dejavniki, kot so podnebne razmere, fizični stres in številne sistemske ter kožne bolezni (Darlenski in sod., 2009).

Oslabljena kožna pregrada ima pomembno vlogo pri nastanku atopičnega dermatitisa (AD) pri psih (Howell in sod., 2007; Jensen in sod., 2009). AD je genetsko pogojeno vnetno in srbeče alergijsko obolenje kože z značilnimi kliničnimi znaki, povzročenimi z razvojem protiteles tipa IgE na alergene iz okolja (Bonnes in Bieber, 2007).

Do vnetja kože pri AD pride zaradi infiltracije limfocitov, monocitov in eozinofilnih granulocitov. Aktivirane vnetne celice sproščajo citokine, reaktivne kisikove zvrsti (angl., reactive oxigen species, ROS) in reaktivne dušikove zvrsti (angl., reactive nitrogen species, RNS) (Portugal in sod., 2007). ROS in RNS so oksidanti, pri preveliki količini le-teh v primerjavi z antioksidanti, se poruši ravnotesje med njimi, kar vodi v oksidativni stres (angl., oxidative stress, OS) (Motta in sod., 2009). Običajno imajo le malo vpliva na organizem zaradi odziva antioksidantne znotrajcelične zaštite (Valko in sod., 2007; Trouba in sod., 2002). OS je vpletjen v patogenezo številnih bolezni, med njimi tudi v AD pri ljudeh (Tsuboi in sod., 1998; Briganti in Picardo, 2003; Tsukahara in sod., 2003) in pri psih (Plevnik in sod., 2012).

V skupino RNS in ROS spadajo prosti radikali, zaradi katerih pride do verižne reakcije in oksidacije predvsem maščob, proteinov in deoksiribonukleinske kisline (DNK) (Droge, 2002). Posledice poškodb DNK vodijo v nastanek mutacij genov, napačnih združitev verig v vijačnici, prekinitev enojnih ali dvojnih verig DNK in celično smrt (Poulsen, 2005). Oksidacija proteinov je posledica slabšega delovanja encimov, medtem ko oksidacija maščob vodi v porušenje celične integritete (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Organizem je v boju s prostimi radikali razvil obrambni mehanizem, sestavljen iz dveh skupin antioksidantov. Prva je skupina antioksidantnih encimov (superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationska peroksidaza (GPX),...) (Valko in sod., 2007) in druga neencimske antioksidantov (vitamin E, vitamin B kompleks,...) (Mates in sod., 1999). Antioksidanti delujejo tako, da uničujejo superokside in proste radikale ali pa spodbudijo mehanizme detoksifikacije znotraj celice. Princip temelji na tem, da antioksidanti oddajo elektron radikalom, ki tako postanejo neaktivni in neškodljivi (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Vitamin E je glavni naravni neencimski antioksidant, topen v maščobi, ki brani kožo pred neželenimi učinki OS (Oh in sod., 2010). Vitamin E je močno prisoten v koži in sicer v celičnih membranah, kjer zagotavlja obrambo pred lipidno peroksidacijo, ki jo povzročajo prosti radikali (Mates in sod., 1999).

Znano je, da je OS vpletен v patogenezo številnih bolezni, med njimi tudi v patogenezo AD tako pri ljudeh kot pri psih. Nekatere raziskave pri ljudeh so pokazale vpliv peroralnega jemanja vitamina E na zmanjševanje patoloških sprememb v koži. Podobno so številne raziskave pri živalih pokazale učinkovito delovanje nekaterih antioksidantov na zaviranje kožne reakcije, izzvane z zunanjimi dražljaji, ki vodijo v nastanek edema, apoptoze, lipidno peroksidacijo, imunosupresijo in nastanek oksidativnih produktov DNK. Vendar pa nikjer v literaturi nismo zasledili raziskav o vplivu vitamina E na citološke in imunohistokemične parametre OS pri psih z AD.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali vitamin E kot antioksidant vpliva na zmanjšanje kliničnih, citoloških in imunohistokemijskih parametrov oksidativnega stresa pri psih z AD.

V raziskavi smo želeli ovrednotiti posamezne parametre OS in primerjati njihove vrednosti pri psih z AD pred in med zdravljenjem z vitaminom E.

V raziskavi smo želeli ovrednotiti sledeče parametre:

- Stopnjo srbeža s pomočjo numerične skale za oceno srbeža
- Obseg kliničnih znakov s pomočjo sistema točkovanja CADESI - 03
- Število kokov in kvasovk na koži psov s citološko preiskavo brisov kože
- Vsebnost trinitrotirozina (3 – NT) in inducibilne sintaze dušikovega oskida (iNOS) v koži psov z imunohistokemičnim barvanjem

1.3. DELOVNE HIPOTEZE

- zdravljenje AD z vitaminom E vpliva na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemično obarvanega 3 – NT.
- uporaba vitamina E je učinkovita in smiselna pri zdravljenju AD pri psih

2. PREGLED LITERATURE

2.1 *Atopični dermatitis*

AD je genetsko pogojeno vnetno in srbeče alergijsko obolenje kože z značilnimi kliničnimi znaki, povzročenimi z razvojem protiteles IgE na alergene iz okolja. Povzroča ga kombinacija genetskih in okoljskih dejavnikov. Bolezen je pri ljudeh v tesni korelaciji z drugimi atopičnimi stanji kot sta astma in alergijski rinitis (Bonnes in Bieber, 2007), medtem ko je glavni tarčni organ pri atopiji psov koža in poglavitna klinična znaka sta vnetje in srbež kože. AD je vsesplošno prepoznano in takoj za preobčutljivostjo na bolše 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 obišče veterinarja; bodisi imajo blago obliko bolezni brez očitnih kliničnih znakov ali pa se ti kažejo v obliki vnetja zunanjega sluhovoda, česar veterinarji velikokrat ne pripšejo AD (Roosje, 2005; Favrot, 2009). Do nedavnega smo glavno vlogo v patogenezi AD pripisovali motnjam v delovanju imunskega sistema. Danes je jasno, da je oslabljena kožna pregrada enako pomembna pri nastanku AD pri ljudeh (Howell in sod., 2007; Jensen in sod., 2009). Znano je, da je vloga kožne pregrade motena pri ljudeh z AD, tako v na videz zdravi koži kot tudi na spremenjenih delih kože (Sakurai in sod., 2002).

2.2 *Vloga kože*

Kože je organ, ki prekriva in ščiti telo. Ima mnogo funkcij. Vloge kože so

1. Zaščina pregrada:

Koža ščiti notranje okolje pred izgubo vode, elektrolitov in makromolekul ter pred vstopom in delovanjem zunanjih kemičnih, fizikalnih in mikrobioloških dejavnikov.

2. Gibanje in oblika:

Fleksibilnost, elastičnost in čvrstost kože omogočajo gibanje in zagotavljajo obliko.

3. Tvorba keratiniziranih struktur

Keratinizirane strukture so dlake, kremplji in rožena plast vrhnjice.

4. Urejanje telesne temperature:

Urejanje telesne temperature omogočajo dlake, žile v koži in žleze znojnice.

5. Skladišče:

Koža je skladišče elektrolitov, vode, vitaminov, maščob, ogljikovih hidratov, proteinov in drugih snovi.

6. Pokazatelj splošnega zdravstvenega stanja, notranjih bolezni in vplivov topikalno nanešenih ali drugače vnesenih snovi.

7. Fizična in spolna identiteta

8. Imunska zaščita

Imunska zaščito kože predstavljajo keratinociti, Langerhansove celice in limfociti, ki kožo ščitijo pred razvojem novotvorb in vztrajanjem infekcij.

9. Pigmentacija.

Tvorba melanina, ožiljenost in keratinizacija določajo določajo barvo dlake in kože. Pigmentacija kože predstavlja zaščito pred sončnim sevanjem.

10. Antimikrobna aktivnost.

11. Senzorično zaznavanje.

Koža je primarni čutilni organ za dotik, pritisk, bolečino, srbenje, mraz in toploto.

12. Sekrecija: znojnih in lojnih žlez.

13. Ekskrecija.

14. Tvorba vitamina D

(Scott in sod., 2001, Darlenski in sod., 2009).

2.3 Kožna pregrada

Zdrava koža predstavlja pregrado, ki preprečuje prekomerno izgubo vode in elektrolitov iz organizma, hkrati pa preprečuje vstopanje snovem iz okolja, kar omogoča življenje na kopnem (Tsuruta in sod., 2002, Feingold in Denda, 2012). Koža organizem ščiti pred mehanskimi, kemičnimi in mikrobiološkimi dejavniki (Tsuruta in sod., 2002).

2.4 Zgradba in delovanje kožne pregrade

Kožna pregrada ni statična tvorba. Prepustnost pregrade uravnavajo različni notranji in zunanji dejavniki, kot so podnebne razmere, fizični stres, številne sistemske ter kožne bolezni (Darlenski in sod., 2009). Koži izpolnjevanje njene vloge omogoča kompleksna zgradba. Kožno pregrado v širšem pomenu besede predstavlja zrnata plast vrhnjice in rožena plast vrhnjice (Darlenski in sod., 2009).

Glavne strukturne komponente kožne pregrade so:

1. Korneociti:

Korneociti so s keratinom napoljeni ostanki keratinocitov v roženi plasti vrhnjice (Scott in sod., 2001). Keratinociti rožene plasti vrhnjice so zloženi v številne sloje, odvisno od dela telesa, ki ga prekriva koža. Zagotavljajo fizično pregrado (Menon in sod., 2012). Keratinociti zrnate plasti vrhnjice kože proizvajajo in izločajo lamelarna telesca, iz katerih nastanejo z lipidi bogate lamelarne membrane. Te se v roženi plasti vrhnjice kože nahajajo zunajcelično in skupaj s korneociti tvorijo t.i. poroženeli celični plašč (angl. cornified cell envelope). Poroženeli plašč opravlja vlogo sekundarne kožne pregrade (Tsuruta in sod., 2002).

2. Korneodesmosomi:

Gradbeno celoto rožene plasti vrhnjice vzdržujejo modificirani dezmosomi (t.i. korneodesmosomi), ki med seboj povezujejo korneocite (Cork in sod., 2006). Delujejo kot tesni stiki (Menon in sod., 2012). Korneodesmosomi se nahajajo v srednji plasti zrnate plasti vrhnjice apikalno od dezmosomov, povezanih s citoskeletom in delujejo kot prva linija obrambe proti izgubi vode (Tsuruta in sod., 2002).

Desmosomi so programirani tako, da se preoblikujejo skozi degradacijski proces in omogočijo deskvamacijo vrhnjega sloja korneocitov, ki so že obrabljeni (Menon in sod., 2012). Ko se korneociti premikajo proti površju rožene plasti vrhnjice, korneodesmosome postopoma razgradijo kožno specifične proteaze in tako se lahko nevezani korneociti luščijo s površja kože (Cork in sod., 2006).

3. "Vsadki" lipolitičnih in proteolitičnih encimov

Encimi imajo naloge procesiranja pregradnih lipidov in degradacije desmosomov. Njihova naloga je, da pomagajo pri obstoječih biokemičnih aktivnostih v roženi plasti vrhnjice, za katero se je včasih mislilo, da je neaktivna in "mrtva" (Menon in sod., 2012).

4. Izločena vsebina epidermalnih lamelarnih teles v prostorih med korneociti rožene plasti vrhnjice in zrnate plasti vrhnjice.

Lipidi rožene plasti vrhnjice kože igrajo pomembno vlogo v vlogi kožne pregrade (Wertz, 1995). V obdobju diferenciacije keratinocitov se vsebina lamelarnih teles iztisne v zunajcelični prostor. Poleg lipidov se iz lamelarnih teles v medcelične prostore iztisnejo tudi lipaze, ki porušijo zgradbo fosfolipidov in glikolipidov. Lipidi, iztisnjeni iz lamelarnih teles, se iz majhnih sploščenih mehurčkov transformirajo v obširne multilamelarne lipidne plošče. Te zapolnjujejo večino medceličnega prostora v roženi plasti vrhnjice in omogočajo delovanje kožne pregrade. (Wertz, 1995). Lipidi naredijo kožo propustno za določene snovi (Menon in sod., 2012). Vsebnost lipidov rožene plasti vrhnjice kože se torej precej razlikuje od sestave večine bioloških membran, saj jih sestavljajo holesterol (25%), ceramidi (50%) in proste maščobne kisline (15%), medtem ko so fosfolipidi prisotni v zelo majhni količini (Groen in sod., 2011, Feingold in Denda, 2012).

Da bi ugotavliali vlogo lipidov v prepustnosti kožne pregrade, so raziskovalci med posameznimi meritvami povečevali vsebnost posameznih lipidov. Povišanje deleža holesterola je zmanjšalo prepustnost pregrade, medtem ko povečanje vsebnosti ceramidov ali prostih maščobnih kislin v eni od raziskav ni imelo posebnega učinka na prepustnost (Groen in sod., 2011). Raziskovalci so ugotavliali tudi spremembe v sestavi lipidnega sloja in prepustnost kožne pregrade pri poškodovani ali suhi koži. Ugotovili so, da lipidni sloj poškodovane ali suhe kože prepušča dvakrat več vode kot normalni (Groen in sod., 2011).

Vse omenjene komponente so zelo pomembne za kožno pregrado (Menon in sod., 2012).

2.5 Oslabljeno delovanje kožne pregrade

Veliko dejavnikov vpliva na tvorbo kožne pregrade. Nastajanje lamelarnih teles je pospešeno pri manjši vsebnosti kalcija v zrnati plasti vrhnjice, pri izraženosti nekaterih citokinov in rastnih faktorjev ter aktivaciji jedrnih hormonskih receptorjev (aktivirani receptorji proliferatorja peroksisoma, jetrni receptorji X, receptorji vitamina D). Nasprotno pa dušikov oksid, glukokortikoidi in testosteron zavirajo tvorbo kožne pregrade. Kadar koža ni sposobna v zadostni meri izpolnjevati vloge kožne pregrade (na primer pri obsežnih opeklinah ali prezgodnjem rojstvu), je posledica smrt ali bolezen (kot je na primer AD ali luskavica) (Feingold in Denda, 2012).

2.6 Oslabljeno delovanje kožne pregrade pri ljudeh in psih z AD

Pri bolnikih z AD so ugotovili gensko predispozicijo za povečano proizvodnjo t.i. himotriptičnega encima v roženi plasti vrhnjice kože. Ta proteazni encim povzroči zgodnje cepljenje korneodezmosomov, kar vodi v oslabitev kožne pregrade. Na povečano proizvodnjo himotriptičnega encima lahko vplivajo tudi nekateri zunanji dejavniki, kot sta na primer pogosto umivanje kože z detergenti ali dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi. Vendarle razgradnjo korneodezmosomov ne pospešujejo le endogene proteaze. Tudi vnetne celice, ki pri AD v povečanem številu migrirajo v vneto kožo, proizvajajo proteaze. Poleg tega je rožena plast vrhnjice izpostavljena mnogim eksogenim proteazam iz okolja, ki jih proizvajajo bakterije (na primer *Staphylococcus aureus*) in hišne pršice (Cork in sod., 2006).

Podobno kot pri ljudeh je bila tudi pri psih z AD dokazana motnja v delovanju kožne pregrade. Oslabljeno delovanje pregrade se kaže v nenormalni strukturi znotrajceličnih lipidnih lamel rožene plasti vrhnjice, nadalje v nenormalni morfologiji celic rožene plasti vrhnjice, v zmanjšani in nenormalni vsebnosti ceramidov, pri nekaterih psih pa tudi v nenormalni izraženosti proteina filagrina. Zaradi naštetih sprememb prihaja do večje izgube

vode iz kože pri psih z AD v primerjavi z zdravimi. Zaenkrat še ni znano, ali so opazovane spremembe pri psih primarne (genetskega izvora) ali sekundarne (posledica atopičnega vnetja kože) (Olivry T., 2011).

2.7 Ocenjevanje delovanja kožne pregrade

Danes poznamo mnogo neinvazivnih metod, ki jih uporabljam za ocenjevanje vloge kožne pregrade. Kvantitativni parametri, s pomočjo katerih opisujemo vlogo kožne pregrade, so t.i. Prekokožna izguba vode (angl., Transepidermal Water Loss, TEWL), hidracija rožene plasti vrhnjice in kislost površine kože. Delovanje kožne pregrade objektivno vrednotimo z merjenjem prekokožne izgube vode. TEWL je občutljiva, pogosto uporabljena metoda za ocenjevanje škodljivih vplivov različnih dejavnikov na delovanje kožne pregrade pri številnih dermatozah (Tupker, 1997). Za neposredno merjenje TEWL se uporablja neinvazivni instrument imenovan evaporimeter (Nonato in Lund, 2001). TEWL omogoča odkrivanje motenj kožne pregrade tudi v zgodnjih fazah bolezni, še preden so opazni klinični znaki. Normalna koža namreč dovoljuje izgubo le majhnih količin vode. V primeru bolezni, na primer pri AD, je izguba vode večja (Mündlein in sod., 2008).

Na voljo so t.i. odprta, zaprta in ventilacijska metoda merjenja TEWL (angl., open chamber, closed chamber, ventilated chamber). Odprta metoda se uporablja za merjenje integritete kožne pregrade. Zaprta metoda se uporablja za merjenje prepustnosti pregrade. Ventilacijska metoda se uporablja za spremjanje bolezni (kot je AD) in merjenje učinkov vnešenih zdravil (Darlenski in sod., 2009). Odprta metoda ne moti naravnega izhlapevanja vode iz kože in omogoča dolgotrajno merjenje, vendar pa je v primerjavi z zaprto metodo izredno občutljiva na gibanje zraka (Mündlein in sod., 2008). Na rezultate merjenja TEWL lahko vplivajo številni zunanji in notranji dejavniki, kot so starost, anatomska mesto, temperatura kože, znojenje, konvekcija zraka, temperatura zunanjega okolja, vlažnost, neposredna svetloba, letni čas in cirkadiani ritem. Princip merjenja TEWL temelji na pomikanju zraka, ki vsebuje vodo, vzdolž dveh senzorjev znotraj merilne glave. Termo- in hidrosenzorji sprejemajo podatke, ki jih procesira mikroprocesor. Vrednost TEWL je najpogosteje izražena v $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ (Darlenski in sod., 2009).

2.8 TEWL pri ljudeh z AD

V več raziskavah so ugotovili povečan TEWL pri ljudeh z AD v primerjavi z zdravimi (Sakurai in sod., 2002; Gupta in sod., 2008). Vrednosti TEWL so bile povečane pri pacientih z AD, ne pa tudi pri pacientih z drugimi alergijskimi stanji. Vrednosti TEWL so se povečevale skladno z obsežnostjo AD (Gupta in sod., 2008). Pri bolnikih z ozdravljenim AD se vrednosti TEWL niso razlikovale od vrednosti pri zdravih ljudeh (Sakurai in sod., 2002). Vrednosti prekokožne izgube vode se razlikujejo pri pacientih z AD z nepoškodovano kožo od tistih z AD in poškodovano kožo. To nakazuje, da pri pacientih z AD, ki nimajo poškodb na koži, ni prisotna okvarjena vloga kožne pregrade (Matsumoto in sod., 2000).

2.9 Vloga mutacije genov pri patogenezi AD

Poleg že opisane pomembne vloge lipidov pri ohranjanju vloge kožne pregrade pri ljudeh raziskovalci ugotavljajo tudi pomembno vlogo proteinov (Howell in sod., 2007). Pri ljudeh z AD so ugotovili mutacije v nekaterih genih, ki so povezani tako s poškodovano kožno pregrado kot z motenim imunskim odzivom. Med geni, pri katerih so ugotavljali spremembe pri ljudeh s kroničnim AD, so številni epidermalni diferenciacijski kompleksi (angl., Epidermal Differentiation Complex, EDC) in geni terminalne diferenciacije. Geni za kožno diferenciacijo določajo nenormalni fenotip, ki je prisoten že od rojstva, torej pred pojavom klinične oblike bolezni. Geni, ki kodirajo glavne terminalne diferenciacijske proteine, imajo pri ljudeh z AD pogosto znižano raven izražanja v primerjavi z zdravimi ljudmi (Suarez-Fariñaz in sod., 2011). EDC kodira strukturne proteine in encime, ki nadzorujejo zunajcelični lipidni metabolizem, molekule, ki povzročajo adhezijo celic in encime, ki spremenjajo/modificirajo proteine (Yu in Lin, 2006).

2.10 Filagrin

EDC je skupina genov, ki kodira številne proteine, vključene v delovanje kožne pregrade. Med njimi je tudi filagrin (Howell in sod., 2007). Filagrin je protein, ki igra ključno vlogo pri nastajanju t.i. poroženelega celičnega ovoja (angl., Cornified Cell Envelope; CCE), pomembnega za učinkovitost kožne pregrade. Filagrin se namreč veže in je odgovoren za agregacijo keratinocitov, kar povzroči sesedanje citoskeleta in tvorbo korneocitov. Korneociti se nato s pomočjo transglutaminaz med seboj močno povežejo in tvorijo CCE (Candi in sod., 2005). Prekurzor filagrina je profilagrin. Profilagrin se v keratinocitih nahaja v keratohialinih zrnčih, kar zrnati plasti vrhnjice daje tipičen histološki videz (O'Regan in sod., 2008). Med procesom diferenciacije se profilagrin defosforilizira in deli na mnogo 37-kd podenot filagrina, ki se agregirajo v keratinskem citoskeletu, ki formira gost proteinsko-lipiden matriks. Monomeri filagrina se naprej degradirajo v t.i. naravne dejavnike vlage (angl., Natural Moisturizing Factors, NMF), ki so pomembni za ohranjanje hidracije kože in normalnega pH kože (Kabashima K., 2012, O'Regan in sod., 2008).

2.11 Vloga filagrina pri miših

V raziskavi, ki so jo opravili na miših s pomanjkanjem filagrina v koži, so ugotovili normalno vsebnost vode v roženi plasti vrhnjice pri vseh miših, ki so imele zdravo kožo. Hidracija kože je bila spremenjena pri liniji miši s povečano vsebnostjo protiteles IgE v serumu in z delecijsko mutacijo gena za filagrin (angl., Flaky tail/matted mice). Čeprav te miši niso bile povsem brez filagrina, je pri njih prihajalo do spontanega pojava vnetja kože. Pred pojavom vnetja kože so bile vrednosti hidracije rožene plasti vrhnjice normalne, prav tako so bile normalne tudi vrednosti TEWL. Po pojavu vnetja kože so se vrednosti spremenile, povečala se je TEWL, zmanjšala pa se je hidracija rožene plasti vrhnjice. S to raziskavo so dokazali, da sta povečana TEWL in zmanjšana hidracija rožene plasti vrhnjice kože posledici vnetja kože (Kawasaki in sod., 2012).

2.12 Vpliv mutacije genov na razvoj vnetne reakcije kože

Degeneriran filagrin povzroča oslabljeno kožno pregrado, posledični vdor alergenov, tvorbo citokinov in vnetno reakcijo.

Filagrin ima pomembno vlogo pri ohranjanju nemotene prepustnosti rožene plasti vrhnjice in s tem pri preprečevanju vdora alergenov (Kawasaki in sod., 2012). Pri ljudeh z AD moteno delovanje kožne pregrade omogoči vdor alergenov. Alergeni se v koži srečajo z Langerhansovimi celicami (angl., Langerhans Cells, LC), vnetnimi dendritičnimi epidermalnimi celicami (angl. Inflammatory Dendritic Epidermal Cells; IDEC) in dermalnimi dendritičnimi celicami (angl. Dermal Dendritic Cells; dDC), kar povzroči aktivacijo limfocitov Th2 (Gittler in sod., 2012; Girolomni in sod. 2001, Guttman – Yassky in sod., 2011).

2.13 Alergijska reakcija

Ko pride do srečanja z alergenom, se zgodita dva pomembna dogodka.

V prvi fazi je pomembna senzibilizacija, kjer antigen predstavitevne celice (angl., Antigen Presenting Cells, APC) prvič "prevzamejo" alergen in migrirajo do bezgavk. Tam se srečajo s primarnimi celicami T in povzročijo preobrazbo celic T v efektorske in spominske celice T. Posledično pride do proizvodnje za alergen specifičnih imunoglobulinov, (npr IgE), ki pripomorejo k večji obrambi ob naslednjem srečanju z antigenom (von Bubnoff in sod., 2001).

V drugi fazi se protitelesa drugič srečajo z alergenom, kar povzroči sprožitev niza vnetnih reakcij. Spominske celice T in specifični imunoglobulini (npr. IgE), ki so vezani na površino APC, se hitro odzovejo na že znano antigensko strukturo alergenov in sprožijo kaskado, ki vodi do kronične vnetne reakcije (von Bubnoff in sod., 2001).

Proces alergijske senzibilizacije je odvisen od različnih celičnih komponent imunskega sistema skupaj s citokini. Atopična bolezen je povezana s povišanjem koncentracije skupnih IgE v plazmi, čemur prispevajo tudi alergensko specifični IgE. Proizvodnjo IgE nadzirajo celice T, ki proizvajajo sorodna in nesorodna sporočila za celice B, te pa izločajo različne citokine, značilne za »pro-alergijski« (tip 2) fenotip. Poleg sprožanja humoralnega imunskega odziva citokini tudi kontrolirajo in uravnavajo funkcionalno stanje efektorskih celic (kot so eozinofilni granulociti, bazofilni granulociti in mastociti). Aktivirane efektorske celice proizvajajo dodatne količine citokinov, vključno z interleukinom 4 (angl., Interleukin 4, IL-4) in interleukinom 5 (angl., Interleukin 5, IL-5), ki pomagajo ohranjati alergijski imunski odziv. Kaskada je na ta način samoohranjujoča. Molekule IgE, na katere se vežejo alergeni, dodatno aktivirajo celice T, ki izločajo citokine (Daser in sod., 1995).

Čas, ki je potreben, da se pokažejo klinični znaki alergijskih reakcij, je zelo različen. Spreminja se od nekaj minut pri tipu I alergijske reakcije pa do 48 ur pri zakasnelem tipu alergijske reakcije (von Bubnoff in sod., 2001).

Ustvarjanje aktivnih primarnih citokinov interlevkina 1a (angl., Interleukin 1a, IL-1a) in interlevkina 1b (angl., Interleukin 1b, IL-1b) iz njihovih neaktivnih prekurzorjev vodi v t.i. kaskado citokinov, ki je primarni vzrok vnetja pri pacientih z AD. Sekundarni vzrok vnetja predstavlja stalen vdor antigenov skozi poškodovano kožno pregrado, kar vodi v prevladujoči infiltrat vnetnih celic Th2 (Kezic in sod., 2012).

Prisotnost degeneriranega filagrina pri ljudeh dokazano povečuje tveganje za nastanek ekcema. Nedavno sprejeta hipoteza predlaga mehansko razumevanje patogeneze ekcema, do katerega privede pojav dedne napake v kožni barieri. Ta se med drugim kaže v oslabljeni obrambi vrhnjice pred alergeni in mikrobi, tej pa sledi polariziran Th2 limfocitni odziv s posledičnim kroničnim vnetjem ter imunskimi reakcijami (Kezic in sod., 2012).

Prisotnost mutiranega filagrina vodi tudi v zmanjšanje NMF rožene plasti vrhnjice in posledično v povišanje pH rožene plasti vrhnjice. Pri atopičnih bolnikih z izraženo mutacijo gena za proizvodnjo filagrina so v roženi plasti vrhnjice kože ugotovili povišane vrednosti interlevkina 1 (angl., Interleukin 1, IL-1). Te vrednosti so bile obratno sorazmerno povezane z vrednostmi NMF. Glede na to, da višji pH aktivira aktivnost proteaz, so raziskovalci vzrok za povečano nastajanje in izločanje provnetnih citokinov IL-1a, IL-1b, interlevkina 18 (angl., Interleukin 18, IL-18) in receptorja antagonista interlevkina 1 (angl., Interleukin - 1 Receptor Antagonist, IL-IRA) pripisali višjemu pH v keratinocitih atopičnih bolnikov z ugotovljeno degeneracijo filagrina v primerjavi z atopičnimi pacienti, ki so imeli normalen protein (Kezic in sod., 2012).

2.14 Vpliv delovanja citokinov Th2 na zmanjšano diferenciacijo keratinocitov in zmanjšano izraženost filagrina

Citokini zavirajo diferenciacijo keratinocitov in vplivajo na zmanjšano izražanje filagrina ter tako povečujejo poškodbe kožne pregrade.

Čeprav genetske študije nedvomno dokazujojo, da je gen, ki kodira filagrin, udeležen pri motenem delovanju kožne pregrade in tako lahko privede do pojava ekcema, je v patogenezi bolezni pri ljudeh še veliko nerazjasnjene zlasti glede bioloških in fizikalno-kemičnih

procesov, ki sodelujejo na poti od mutiranega genetskega zapisa do kliničnega izražanja vnetnih kožnih sprememb in dovzetnosti za druge klinične manifestacije AD (O'Regan in sod., 2008).

Nedavne genetske raziskave pri ljudeh so pokazale, da imajo mutacije gena, ki kodira filagrin, za posledico moteno delovanje kožne pregrade. Vendar pa so to gensko okvaro odkrili le pri eni tretjini ljudi z AD. Ker pa ima večina ljudi z AD moteno delovanje kožne pregrade, morajo biti prisotni dodatni mehanizmi, ki spremenijo izražanje filagrina in integriteto kožne pregrade (Palmer in sod., 2006; Weidinger in sod., 2006; Marenholz in sod., 2006). Pri akutni obliki AD so ugotovili pretirano izražanje Th2 citokinov interlevkina 4 (angl., Interleukin 4, IL – 4) in interlevkina 13 (angl., Interleukin 13, IL-13). Raziskovalci so dokazali, da omenjena citokina zavirata izražanje filagrina v poroženelih celicah kože. Ugotovili so manjšo izraženost filagrina celo pri keratinocitih, ki so bili že diferenciirani. Rezultati te raziskave kažejo, da je pomanjkanje filagrina pri bolnikih z AD najverjetnejše posledica delovanja Th2 citokinov. Nevratalizacija IL-4 in IL-13 bi bila torej pri zdravljenju bolnikov z AD smiselna, saj bi lahko izboljšala integriteto kožne pregrade (Howell in sod., 2007).

Za stanje kože pri pacientih z akutno obliko AD je torej značilno pretirano izražanje Th2 citokinov IL-4 in IL-13. Sama prisotnost IL-4 in IL-13 pa tudi vpliva na izražanje filagrina, saj med diferenciacijo filagrina iz profilagrina povzroči zaviranje njegovega izražanja. Tako lahko domnevamo, da so za pomanjkanje filagrina pri pacientih z AD krivi citokini Th2 (M.D. Howell in sod., 2007). Citokini IL-4, IL-13 in interlevkin 22 (angl., Interleukin 22, IL – 22), ki jih proizvajajo limfociti Th2 in Th22 zavirajo končno diferenciacijo keratinocitov in na ta način pripomorejo k poškodbam kožne pregrade pri bolnikih z AD (Gittler in sod., 2012).

2.15 Srbež v patogenezi AD

Celice Th2 proizvajajo tudi citokine interlevkin 31 (angl., Interleukin 31, IL – 31), ki spodbujajo srbež in preko keratinocitov zmanjšujejo izražanje filagrina (Kabashima, 2013).

Srbež je eden izmed glavnih simptomov AD. Praskanje povzroči mehansko poškodbo, posledica je proizvodnja provnetnih citokinov IL-1, IL-18, tumorje nekrotizirajočega faktorja alfa (angl. Tumor necrosis factor alpha, TNF- α) in spodbujajočega dejavnika za kolonije

granulocitov (angl., Granulocyte Macrophage Colony – Stimulating factor, GM-CSF) ter kemokinih ligandov 27 (angl., Chemokine (C – C motif) ligand 27, CCL27). Posledično kemokini ligandi (CCL1, CCL11, CCL18, CCL22, CCL26 in CCL27) v sodelovanju z adhezijskimi molekulami privabljajo levkocite v kožo. V koži se različni tipi levkocitov aktivirajo na različne načine:

1. Spominske T celice se srečajo z za njih specifičnimi antigen-alergeni ali bakterijskimi superantigeni.
2. Epiteljski citokini naročajo DC, da spodbudijo Th2 celično diferenciacijo
3. DC vežejo antigen specifične IgE komplekse in tako ujamejo antigen ter imajo močne sposobnosti predstavitev antiga.
4. Antigen specifični IgE kompleksi sprožijo agregacijo Fcε receptorjev in aktivirajo mastocite
5. Efektorski citokini (IL-4 in IL-13) aktiviranih TH2 celic zavrejo proizvodnjo antimikrobnih peptidov. Virusi, glive in bakterije (npr. *S. aureus*) izkoristijo priložnost zmanjšanih antimikrobnih peptidov v koži atopičnih posameznikov, kolonizirajo kožo in sprostijo provnetne snovi (superantigene, proteoglikane, lipoteihoično kislino), kar vpliva na aktivacijo levkocitov. Aktivacija levkocitov se kaže v sproščanju vnetnih mediatorjev, vključno z efektorskimi citokini (IL-31) in proteazami (triptazami), kar skupaj z neuropeptidi, ki jih pogojuje stres, ojača signale srbenja (Horney in sod., 2006).

V raziskavi, kjer so eksperimentalno povzročili poškodbe kožne pregrade (z nanašanjem acetona na kožo in drgnjenjem ali z odstranjevanjem rožene plasti vrhnjice s pomočjo samolepilnega traku, kar je povzročilo lipidno ekstrakcijo oziroma fizično odstranitev pregrade) so ugotovili povečano vdiranje antigenov v kožo in vzdrženo stanje imunskega sistema. Drgnjenje z acetonom je povzročilo sproščanje Th1 kemokinov, vključno z kemokinim ligandom 9 (angl. Chemokine (C – X – C motif) ligand 9, CXCL9) in kemokinim ligandom 11 (angl., Chemokine (C – X – C motif) ligand 11, CXCL11), odstranjevanje celic s samolepilnim trakom pa je povzročilo sproščanje Th2 kemokinov, vključno z CCL17, CCL22 in CCL5. Obe metodi spodbudita proizvodnjo dejavnikov takojšnjega imunskega odziva, kot so TNF- α , IL-1a, IL-1b, IL-8 in GM-CSF. Poškodovana kožna pregrada je bila povezana s povišano vsebnostjo LC in dDC v koži ter prehodno aktivacijo T limfocitov (Gittler in sod., 2012).

2.16 Vloga oksidativnega stresa pri AD

Za vnetje kože pri AD je značilna intenzivna infiltracija limfocitov, monocitov in eozinofilnih granulocitov. Aktivirane vnetne celice sproščajo citokine, ROS in RNS (Portugal in sod., 2007), kar prispeva k razvoju rdečine, oteklina, vnetja, preobčutljivosti in keratinizacije kože pri AD (Nachbar in Korting, 1995). Vezava alergena z IgE, pripetih na mastocite v koži, sproži kopičenje ROS in posledično degranulacijo mastocitov. Pri tem se v okolno tkivo sprostijo velike količine biogenih aminov, ki prispevajo k vnetju (Mate in sod., 2000). Cirkulirajoči polimorfonuklearni levkociti ljudi z AD so hiperaktivni in povečano sproščajo ROS. To vodi v posledične oksidativne poškodbe kože in širjenje vnetja (Briganti in sod., 2003; Omata in sod., 2001).

ROS in RNS v stanju homeostaze torej sodelujejo pri urejanju celičnih funkcij in delujejo kot mediatorji in sporočilne molekule (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Citokini in rastni faktorji npr. lahko specifično spodbudijo nastanek superoksidnega radikala (O_2^{\bullet}) in vodikovega peroksida (H_2O_2), ki igra vlogo sekundarnega mediatorja pri uravnavanju redoks statusa posameznih komponent sporočilnih poti, kot so receptorji rastnih faktorjev, proteini Ras, proteinske kinaze, proteinske fosfataze in prepisovalni dejavniki (Briganti in sod., 2003). Po drugi strani pa lahko prekomerna koncentracija O_2^{\bullet} ali H_2O_2 premakne redoks celično ravnotežje v stanje, ki vodi v oksidativne poškodbe in mehanizme apoptoze (Briganti in sod., 2003).

Oksidativni stres je vpletен v patogenezo številnih bolezni, med njimi dokazano tudi v patogenezo AD pri ljudeh (Tsuboi in sod., 1998; Briganti in Picardo, 2003; Tsukahara in sod., 2003) in pri psih (Plevnik in sod., 2012). Znana je ključna vloga beljakovin PPAR (angl. peroxisom proliferator activated receptors), ki vodi v prekomerno aktivacijo aktivator proteina 1 (angl. Activator Protein 1, AP1) in posledično povečano nastajanje (hiperprodukциjo) vnetnih citokinov keratinocitov pri AD (Briganti in sod., 2003).

2.17 Oksidativni stres pri ljudeh z AD

Raziskovalci so ugotovili, da pri ljudeh z AD že v času pred pojavom klinične oblike bolezni nepretrgoma prihaja do oksidativnih poškodb proteinov, kar sčasoma napreduje v klinično obliko bolezni z vnetjem kože. Predpostavili so, da oksidativne poškodbe proteinov pripomorejo k oslabitvi delovanja kožne pregrade, kar posledično privede do povečanega vdora alergenov in njihove vezave na antigen-prezentirajoče celice v koži (LC in DC). Proizvodi (aldehidi, 4-HNE), ki nastanejo pri oksidaciji nenasičenih maščobnih kislin z ROS, dokazano izsušijo kožo, kar je eden od glavnih znakov AD. Več raziskovalcev je ugotovilo, da OS pogosteje nastane v bolj površinskih slojih kože, ki so tudi bolj izpostavljeni zunanjim vplivom. V koži zdravih oseb so dokazali nastajanje dinitrofenilhidrazona (DNP) iz dinitrofenilhidrazina (DNPH) vendar v manjšem obsegu, kar dokazuje, da do pojava OS prihaja tudi pri zdravih osebah zaradi stalnih škodljivih vplivov okoljskih dejavnikov (na primer UV žarki) (Niwa in sod., 2003). Zunanji izvor ROS so ionizirajoča in neionizirajoča sevanja, onesnažen zrak, ozon, kemikalije in različni toksini. Prav tako lahko nekatere diete z neustreznimi količinami hraničnih snovi posredno vodijo v OS zaradi negativnega vpliva na celične obrambne mehanizme (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

2.18 Nastanek oksidativnega stresa

OS je stanje porušenega ravnotesja med količino oksidantov in antioksidantno kapaciteto v organizmu. Oksidanti so ROS in RNS, ki fiziološko ves čas nastajajo v mitohondrijih (v procesu aerobnega metabolizma nastajata superoksidni anion in vodikov peroksid), v aktiviranih fagocitih (dušikov oksid, hipoklorna kislina in superoksidni anion), v peroksisomih, ki razgrajujejo maščobne kisline in druge snovi (vodikov peroksid), v jetrnih celicah pri oksidaciji številnih endogenih in eksogenih spojin s pomočjo citokromov P-450 ter pod vplivom ultravijoličnega (UV) in ionizirajočega sevanja (Khansari in sod., 2009; Klauning in sod., 2010, Cerutti in sod., 1994). K nastanku ROS prispevajo tudi nekateri mikroorganizmi, ki imajo sposobnost neposredne oksidacije (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Ponavadi ima prisotnost ROS malo posledic zaradi hitrega odziva antioksidantne

znotrajcelične zaščite. Nastajanje ROS in RNS urejajo encimi, kot je na primer sintaza dušikovih oksidov (angl. Nitrogen oxide synthase, NOS) in nikotinamin adenin dinukleotid fosfat (NAD(P)H). Povečana proizvodnja ROS (ki se zgodi zaradi mitohondrijske transportne verige elektronov ali pretirane stimulacije NAD(P)H) pa lahko vodi v nastanek OS (Valko in sod., 2007; Trouba in sod., 2002).

2.19 Reaktivne kisikove in dušikove zvrsti

Med RNS štejemo dušikov oksid (NO^\bullet) in peroksinitrit (OONO^\bullet) (Halliwell in Cross, 1994; Halliwell in Gutteridge, 1999), med ROS pa vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik (${}^1\text{O}_2$), hipoklorno kislino (HOCl) in proste radikale, kot na primer superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoksidni radikal (OH_2^\bullet), hidroksilni radikal ($^\bullet\text{OH}$) in nekatere druge (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 (Šuput in Kamarić, 2003; Wink in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999). 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) sproži verižno reakcijo nastajanja novih prostih radikalov, ki zopet reagirajo z drugimi molekulami. Verižna reakcija se tako nadaljuje, pri čemer lahko pride do oksidativnih poškodb tarčnih molekul (Droge, 2002).

Celične makromolekule, kot so DNK, proteini in lipidi, so glavne tarče oksidacije. Poškodbe DNK vodijo v mutacije genov, napačne združitve verig v vijačnici, prekinitve enojnih ali dvojnih verig DNK in končno v celično smrt (Poulsen, 2005). Oksidacija proteinov vodi v slabše delovanje encimov. Oksidacija maščob, posebej nenasičenih maščobnih kislin, ki so dovetne za oksidacijo in so del celičnih membran, vodi v porušenje celične integritete (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

2.20 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je vrsta kemijskih reakcij, ki vključujejo oksidativno poškodbo nenasičenih maščobnih kislin. Ker biološki sistem vsebuje nezanemarljive količine kisika in nenasičenih maščobnih kislin, lipidna peroksidacija z razbitjem celičnih struktur pomembno sodeluje v etiologiji mnogih bolezni. Povečan vnos antioksidantov lahko prepreči lipidno peroksidacijo *in vivo* (Duthie, 1993).

Za nastanek lipidne peroksidacije so odgovorni prosti radikali. Kot smo že omenili, so to reaktivne molekule s prostim elektronom, ki nastajajo v procesu aerobnega metabolizma. Primer je superoksidni radikal (O_2^-) ki nastane s sprejemanjem dodatnega elektrona na molekulo kisika ($O_2 + e^- = O_2^-$) (Duthie, 1993).

Superoksidni radikal nastane z izgubo elektronov v mitochondrialni dihalni verigi. Prosti kisikovi radikali nastanejo z oksidacijo nekaterih sladkorjev, vključno z glukozo in tioli (Halliwell, 1991). Drugi izvor prostih kisikovih radikalov so fagocitne celice, makrofagi in monociti, ki zaradi povečanega privzema kisika v zunajcelično tekočino izločajo večje količine O_2^- . Pri reakciji dizmutacije, ki je lahko neencimska ali pa jo katalizira SOD, se O_2^- pretvori v vodikov peroksid (H_2O_2). V prisotnosti železovih ali bakrovih ionov vodikov peroksid lahko reagira z O_2^- , pri čemer nastane visoko reaktivni hidroksilni radikal ($OH\cdot$) (Duthie, 1993).

$OH\cdot$ lahko povzroča poškodbe številnih bioloških molekul, kot so proteini, tioli (organske skupine, ki imajo funkcionalno skupino iz žveplovega atoma, na katero je vezan vodik -SH) in nukleinske kisline. Hidroksilni radikal z odvzemom vodikovega atoma nenasičenim maščobnim kislinam sproži proces lipidne peroksidacije. Potencialni sprožilec lipidne peroksidacije so tudi cigaretni dim, onesnaževalci, halogenirani ogljikovodiki in ionska radiacija) (Duthie, 1993).

Odvezem vodikovega atoma (s strani prostega radikala) nenasičenim maščobnim kislinam vodi do verižne reakcije, pri čemer nastaja več kot 60 endogenih produktov, od katerih so številni citotoksični (Esterbauer in sod., 1991).

Reakcijo lipidne peroksidacije lahko že v manjših koncentracijah zaustavijo ali preprečijo antioksidanti (A:H) (Duthie, 1993).

A• je mnogo manj reaktiv in tako potencialno manj nevaren radikal. Če je kapaciteta antioksidantov močno zmanjšana, lahko pride do hudih poškodb celic in tkiv. Kapaciteta antioksidativnega obrambnega sistema je odvisna od vnosa antioksidantov s hrano (Duthie, 1993).

2.21 Atopični dermatitis in iNOS

Kot smo že omenili, pride pri AD do intenzivne infiltracije limfocitov in eozinofilnih granulocitov v koži. Te celice sproščajo pro-vnetne citokine, ROS ter encime, ki katalizirajo nastajanje velikih količin RNS. Eden izmed teh encimov je iNOS (ter Steege in sod., 1997). V parenhimskih in neparenhimskih jetrnih celicah iz L-arginina s pomočjo iNOS nastaja dušikov oksid. V normalnih koncentracijah deluje zaščitno na jetrne celice in zavira poškodbe tkiv in citotoksične efekte, povzročene z mikroorganizmi, paraziti ali tumorskimi celicami. Škodljivo deluje zaradi reakcije s superoksidnim anionom, s katerim tvori peroksinitrit, ki deluje močno oksidativno in nitracijsko (Calvisi in sod., 2004). Pri reakciji peroksinitrita z beljakovino tirozin nastaja 3 – NT, ki je pogosto merjen označevalec nastajanja RNS *in vivo*. Prosti radikali so namreč prekratke življenske dobe, da bi jih lahko merili neposredno, zato običajno merimo produkte, ki nastanejo v reakcijah s prostimi radikali in na ta način ocenujemo OS (Girault in sod., 2001, Tanaka in sod., 1997, Beal, 2002, Radabaugh in sod., 2008).

2.22 *iNOS pri ljudeh*

Raziskave pri ljudeh kažejo, da povečana imunoreaktivnost iNOS in povečana koncentracija nitriranih proteinov povzročata oksidativno poškodbo s pomočjo delovanja peroksinitrita, kar dokazano sodeluje v patogenezi sporadične amiotropne lateralne skleroze pri ljudeh. Povečana vsebnost in povečana imunoreaktivnost iNOS kažeta na to, da je OS povezan z degeneracijo nevronov (Sasaki in sod., 2000).

Prevelika proizvodnja dušikovega oksida in njegovega derivata peroksinitrita povzročata vnetje in poškodbo tkiva, kar pospešuje nastajanje tumorjev. Dušikov oksid igra pomembno vlogo v karcinogenezi, saj spodbudi poškodbo tkiva oz. DNK. Posledica je spodbujanje angiogeneze in nepravilna celična diferenciacija (Ahn in sod., 1999). Povečana proizvodnja dušikovega oksida povzroči, da pride do zakasnitve pri popravilih kožne pregrade (Feingold in Denda, 2012).

2.23 *Nitracija tirozina*

Nitriti in nitriti (ki so pogost dodatek mesnim in ribjim proizvodom, saj delujejo antimikrobeno) so oksidacijski produkti in izvor za nastanek dušikovega oksida. Poleg želenega antimikrobnega učinka pa imajo lahko tudi neželene stranske učinke in sicer lahko povzročijo methemoglobinemijo. Pri reakciji z določenimi amini tvorijo karcinogene nitrozamine (Chow in Hong, 2002).

Obstajajo specifični proteini, ki so prednostna tarča nitracije. Nitracija tirozina je posttransacijska modifikacija, ki je prisotna v številnih patoloških stanjih, povezanih z nastanjem peroksinitrita. Pri tvorbi peroksinitrita se stabilni oblici dušikovega oskida in superoksida spremenita v aktivni obliki in sta tako zmožni nitracije tirozina (Quijano in sod., 2005).

Vnetna stanja povzročajo spremembe tirozina, pri čemer v enaki količini kot 3 - NT nastajata tudi triklorotirozin in tribromotirozin. Glede na učinkovanje na biološko aktivnost je nitracija

tirozina nevarnejša od fosforilacije tirozina, ki sicer tudi pomembno vpliva na celični metabolizem in sporočilne poti, vendar je fosfotirozin, ki pri fosforilaciji nastaja, manj stabilen kot nitrotirozin. Fosfataze ga hitro odstranijo in je tako njegov škodljivi učinek kratkotrajnejši (Souza in sod., 2008).

Nitracija tirozina ima tri glavne učinke: Vpliva na vlogo proteinov, spreminja potek fosforilacije in spodbudi imunološki odziv. Nitrirane proteine navadno prepozna in razgradi proteasomski sistem. Nitracija in dimerizacija tirozina povzročata združevanje proteinskih filamentov in agregatov, kar olajšuje hidrofobne interakcije. Proteasomi slabo delujejo na omenjene aggregate, ki se tako akumulirajo kot intra- ali zunajcelični amiloidi. Metabolizem nitriranih proteinov vključuje tudi redukcijo nekaterih (še nepoznanih) bioloških reduktantov oziroma odstranitev nitro skupine domnevno s strani denitraznih encimov. Ti procesi morda (ali pa tudi ne) vključujejo nastanek 3-aminotirozina, ki se lahko oksidira nazaj v 3-NT. Med razvojem kroničnih nevroloških bolezni se proteini oksidirajo, nitrirajo in navzkrižno povežejo tako, da postanejo neugoden substrat za delovanje proteasomov. Edini način za nadziranje velikih količin tako spremenjenih proteinov je tvorba agregatov, ki se odlagajo v celici, ki poskuša preživeti. V proteinskih in lipoproteinskih agregatih je prisoten 3-NT, kar kaže na to, da je nitracija poleg ostalih, od prostih radikalov odvisnih procesov, odgovorna za nastajanje agregatov (Souza in sod., 2008).

2.24 3 - nitrotirozin

3 - NT nastaja *in vivo* pod številnimi patološkimi pogoji. Številni reagenti so odgovorni za nitracijo tirozina *in vivo*, med njimi peroksinitrit in nitrit v prisotnosti H₂O₂ oziroma peroksidaz. Metmioglobin in methemoglobin sta v prisotnosti nitritov in H₂O₂ prav tako zmožna nitracije tirozina. V prisotnosti nitrita in prostega tirozina, reakcija metmioglobina/methemoglobina privede do nastanka velikih količin 3 – NT. Pod patološkimi pogoji, ko je koncentracija nitritov povišana, to prispeva k nitraciji tirozina - prostega ali vključenega v proteine. V primeru prisotnosti metmioglobina, H₂O₂ in dušikovega dioksida je količina nitracijskih produktov velika (Herold, 2004).

Na nastajanje in dostopnost superoksida in dušikovega oksida vpliva vitamin E. Povečana vsebnost peroksinitrita – posledica zdravljenja z nitriti in nizke vsebnosti vitamina E v prehrani je ključnega pomena za nastanek tkivnih poškodb (Herold, 2004).

2.25 Antioksidanti in antioksidativno delovanje

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 SOD, CAT, GPX in glutationska reduktaza (GSH) (Valko in sod., 2007) ter skupina neencimskih antioksidantov, v katero spadajo vitamin E, vitamini B kompleksa in številni drugi (Mates in sod., 1999). Antioksidantni mehanizmi delujejo na tri načine: popravljajo oksidativne poškodbe (antioksidativno delovanje), odstranjujejo oksidativne poškodbe (encimi, ki so sposobni prepoznavanja poškodovanih molekul DNK) ali enkapsulirajo nepopravljive poškodbe (apoptoza) (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Antioksidativno delovanje temelji na uničevanju superoksidov in prostih radikalov ali pa spodbuditvi mehanizmov detoksifikacije znotraj celice (Mates, 2000). Antioksidanti oddajo elektrone oksidantom, ki tako postanejo nereaktivni in neškodljivi za makromolekule. Antioksidanti na ta način sami postanejo radikali, vendar so mnogo manj reaktivni od oksidantov in tako nezmožni povzročiti celične poškodbe. Oksidirani antioksidanti so podvrženi obnovi v osnovno reducirano obliko s pomočjo učinkovitih celičnih procesov, ki energijo jemljejo iz NADPH (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Številne študije na živalih so pokazale učinkovitost antioksidantov kot so α -tokoferol, askorbat in β -karoten pri zaviranju kožne reakcije izzvane z UV žarki ali drugimi dražljaji, ki vodijo v nastanek edema, apoptozi, lipidno peroksidacijo, imunosupresijo in nastanek oksidativnih produktov DNK. Na delovanje antioksidantov vpliva njihova biološka dostopnost pri peroralni aplikaciji. Topikalna aplikacija antioksidantov je lahko nezadostna za uničenje ROS v tarčnem mikrookolju. Antioksidanti za svoje delovanje potrebujejo posebne pogoje (Briganti in sod., 2003).

2.26 Vitamin E in njegovo delovanje

Vitamin E je glavni naravni neencimski antioksidant, topen v maščobi, ki brani kožo pred neželenimi učinki OS (Oh in sod., 2010).

Vitamin E je močno prisoten v koži in sicer v celičnih membranah, kjer zagotavlja obrambo pred lipidno peroksidacijo, ki jo povzročajo prosti radikali. Povečana lipidna peroksidacija lahko spodbudi imunski in vnetni odziv (Mates in sod., 1999).

Vitamin E ima vsaj 8 znanih kemijskih oblik (štirje tokoferoli in štirje tokotrienoli) s številnimi različnimi biološkimi aktivnostmi. Najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol (Thakur in Srivastava, 1996). α -tokoferol je v primerjavi z drugimi oblikami vitamina E najbolj aktivna oblika zato, ker ga jetra favorizirajo s tem, ko pospešeno metabolizirajo druge oblike vitamina E (Traber in Atkinson, 2007). Po absorbciiji in transportu s pomočjo hilomikronov se α -tokoferol nalaga v parenhimske celice jeter. Zaradi svoje lipofilne zgradbe se nalaga s pomočjo lipoproteinov v celičnih membranah in v maščobi, kjer reagira z molekularnim kisikom in prostimi radikali. Deluje kot lovilec prostih radikalov in ščiti nenasičene maščobne kisline in membrane pred peroksidacijo (Thakur in Srivastava, 1996). Vitamin E, najbolj učinkovit lovilec lipidnih peroksilnih radikalov, zmanjšuje kromosomalne poškodbe, povzročene s strani prostih radikalov. α - tokoferol (vitamin E) z oddajanjem vodikovega atoma nenasičenim maščobnim kislinam iz hidroksilne skupine učinkuje močno antioksidantno (Duthie, 1993).

Koncentracija vitamina E je največja v celičnih membranah, vendar kljub vsemu ne preseže 1 molekule vitamina E na 2000 molekul fosfolipidov. To kaže na možnost hitre regeneracije s pomočjo vitamina C in drugih reduktaz (Packer in Landvik, 1989).

2.27 Delovanje vitamina E pri ljudeh

Poleg antioksidantne vloge je α -tokoferol pri ljudeh dokazan vmesni produkt v presnovi arahidonske kisline, prostaglandinov, proteinov, lipidov in nukleinskih kislin, sodeluje pri delovanju mitohondrijev, prozvodnji spolnih hormonov in vzdržuje integriteto dolgoverižnih nenasičenih maščobnih kislin v celičnih membranah in njihovo bioaktivnost (Traber in Atkinson, 2007; Thakur in Srivastava, 1996). Poleg zaviranja delovanja protein kinaze C (angl. Protein kinase C, PKC) in rasti gladkih mišičnih celic žil, zavira tudi agregacijo trombocitov, proizvodnjo dušikovega oksida v endotelnih celicah in proizvodnjo superokksida v nevtrofilnih granulocitih in makrofagih. α -tokoferol zavira PKC s pomočjo aktivacije protein fosfataze A. Posledica zaviranja PKC v večini celic je anti-aterosklerozni in antitumorozni učinek *in vivo*. Prav tako α -tokoferol vpliva na izraženost številnih genov (Azzi in sod., 2002). Vitamin E zavira tudi aktivacijo endonukleaze, ki nastaja pri znotrajceličnem OS. Kot antioksidant ima zaščitno vlogo pred hemolitično anemijo, zmanjšuje tveganje za nastanek srčnih bolezni, rakavih obolenj, nevroloških bolezni, katarakte, retinopatij in artritis ter upočasnuje proces staranja (Thakur in Srivastava, 1996, Claycombe in Meydani, 2001). α -tokoferol izboljša imunski odziv, odvisen od makrofagov, zmanjša proizvodnjo in/ali sproščanje prostaglandinov in zmanjša koncentracijo serumskih IgE pri ljudeh z AD (Tsourelis – Nikita in sod., 2002).

2.28 Merjenje vsebnosti vitamina E

Če bi se oksidiran α -tokoferol nalagal ali se izločal v zaznavnih količinah, bi njegovo količino lahko merili neposredno in tako prikazali njegovo antioksidantno vlogo. Vendar α -tokoferol med antioksidantno aktivnostjo tvori tokoferoksilni radikal, ki ga reducirajo drugi antioksidanti (na primer vitamin C in koencim Q₁₀). Oksidativni produkti α -tokoferola so torej zelo kratkotrajni in jih ni mogoče izmeriti *in vivo* (Traber in Atkinson, 2007). Njegovo delovanje zato vrednotimo posredno, z merjenjem encimov, ki sodelujejo pri peroksidaciji ali z merjenjem produktov peroksidacije. V procesu lipidne peroksidacije nastaja iz večkrat

nenasičenih maščobnih kislin vrsta produktov - aldehidi, ketoni, ogljikovodiki, epoksi, prosti radikali. Najpogosteje obravnavani in merjeni produkt je malondialdehid (MDA) (Esterbauer in sod., 1991; Gallaher in sod., 1993). Določena količina MDA v organizmu vedno nastaja v metabolizmu prostaglandinov (Basu in Marnett, 1983; Halliwell in Chirico, 1993), zato so majhne koncentracije MDA v tkivih, telesnih tekočinah in seču vedno prisotne. Povečane koncentracije MDA (ki nastajajo pri povečanem obsegu lipidne peroksidacije v stanju OS) pa so organizmu škodljive. MDA je namreč zelo reaktivna molekula, za katero ugotavlja, da je karcinogena, mutagena, strupena za jetrne celice in je pobudnik različnih nezaželenih reakcij. Reagira lahko z lipidi in beljakovinami, inaktivira ribonukleaze ter druge encime in se kovalentno veže na nukleinske kisline. Nasprotno merjenju MDA pa merjenje encimov, ki pri peroksidaciji sodelujejo, ni tako zanesljiv način vrednotenja OS, saj na primer aktivnost glutation reduktaze ostaja enaka v celicah z manj in v celicah z dovolj vsebnosti vitamina E, ker se v celici neprestano obnavlja (Mazor in Brill, 1997). GPX katalizira redukcijo različnih hidroperoksidov, pri čemer uporablja glutation, ki pri tem prehaja iz reducirane v oksidirano obliko (Mates in Sanchez-Jimenez, 2000, Imai in Nakagawa, 2003). V nedavni raziskavi so ugotovili, da ni razlik v aktivnosti GPX pri psih z AD, ki so bili zdravljeni z vitaminom E v primerjavi s psi, ki so bili zdravljeni s placeboom (Plevnik, 2012). Tudi aktivnost encima superoksidne dismutaze (SOD) ostaja enaka pri manjši in zadostni količini vitamina E, tako pri ljudeh kot pri psih (Mazor in Brill, 1997, Plevnik 2012). Superoksidna dismutaza znatno pospeši reakcijo dismutacije, v kateri pretvarja reaktivni $O_2^{•-}$ v manj reaktivni H_2O_2 . Funkcijsko je sklopljena z GPX in katalazo, ki katalizirata nadaljnji razkroj H_2O_2 (Gutteridge, 1994; Mates in sod., 1999; Mates in Sanchez-Jimenez, 2000). Aktivnost katalaze, ki razkroji del hidroksiperoksida, je zmanjšana v celicah z manjšo vsebnostjo vitamina E. Zmanjšana aktivnost katalaze se povrne na normalno pri dodajanju vitamina E (Mazor in Brill, 1997).

V eni od raziskav so pri večini ljudi z AD, vključenih v raziskavo, izmerili visoko aktivnost SOD. Najvišje vrednosti SOD so izmerili pri osebah z zmerno obliko AD, pri osebah s hudo klinično obliko AD pa so bile izmerjene vrednosti SOD manjše, kot pri zdravih kontrolnih osebah. Rezultate so avtorji razložili na dva načina. Prva možnost bi bila, da pri bolnikih z manjšo indukcijsko sposobnostjo SOD prihaja do hujših oblik AD. Druga možnost pa je, da je velika količina nastalega H_2O_2 inaktivirala SOD (Niwa in sod., 2003), kot je bilo dokazano v eni od starejših raziskav (Hodgson and Fridovich, 1975).

Vsebnost vitamina E so najpogosteje merili v plazmi. Plazemske koncentracije vitamina E so močno povezane s koncentracijo transportnih lipidov, kot so holesterol in trigliceridi. Pri sistemskem vnetnem odgovoru je lahko koncentracija plazemskih lipidov in lipoproteinov spremenjena in je merjenje koncentracije vitamina E v tem primeru lahko nezanesljivo. Zato je merjenje koncentracije α -tokoferola bolj zanesljivo v eritrocitih kot v plazmi (Vasilaki in sod., 2009).

2.29 CADESI

Stopnjo AD pri psih objektivno lahko ocenujemo s pomočjo točkovnih sistemov. Teh ni veliko na razpolago. V raziskavah je največkrat uporabljen sistem CADESI (angl. Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, CADESI). Prvotno je bil ta sistem povzet in pripredjen po človeškem sistemu SCORAD (angl. SCORing Atopic Dermatitis) (Germaini in sod., 2005). Posebna skupina strokovnjakov, diplomatov Evropskega in Ameriškega Kolidža za veterinarsko dermatologijo, združenih v mednarodno delovno skupino za atopični dermatitis psov (International Task Force on Canine Atopic Dermatitis, ITFCAD) je sistem v zadnjih nekaj letih dvakrat posodobila in dopolnila. Danes je v uporabi tretja različica sistema, t.i. sistem CADESI-03, ki velja za edini strokovno priporočen, objektiven in ustrezno validiran evalvacijski sistem za določanje stopnje in obsega bolezni ter za vrednotenje uspeha določene metode zdravljenja AD pri psih (Olivry in sod., 2007). Podrobno smo sistem CADESI-03 razložili v poglavju Material in metode.

2.30 Dosedanji pristopi k zdravljenju AD

ITFCAD predлага kombiniran pristop k zdravljenju AD pri psih. Akutne spremembe najbolje zdravimo z uporabo nedražečih šamponov in topikalnih glukokortikoidnih hormonov. Po potrebi pridejo v upoštev tudi peroralni glukokortikoidni hormoni in antimikrobnna terapija. Ugotoviti je potrebno etiološke dejavnike AD. Znani potencialni vzroki so sestavine hrane, bolšja slina, bakterije (stafilocoki), glice (kvasovke, kot je *Malassezia pachydermatis*) in

okoljski alergeni. Higieno kože in dlake vzdržujemo z uporabo nedražečih šamponov. V hrano dodajamo esencialne maščobne kisline (Olivry in sod., 2010).

Za razliko od mononenasičenih maščobnih kislin, ki nastajajo iz acetilkoencima A, polinenasične maščobne kisline ne nastajajo v tkivih sesalcev. V rastlinah nastajata dva glavna predhodnika n – 6 in n – 3 omega maščobnih kislin. Linolna kislina, prevladujoča rastlinska n – 6 polinenasičena maščobna kislina je predhodnik arahidonske kisline in eikozanoidov (Catala, 2010).

α – linolenska kislina, prevladujoča rastlinska n – 3 polinenasičena maščobna kislina je predhodnik dokozaheksanojske kisline (Catala, 2010). Eikozanoidi igrajo obsežno vlogo v homeostatskih mehanizmih v koži. Prav tako so pomembni tudi kot mediatorji vnetnih procesov, ki so posledica okoljskih dejavnikov, kot na primer ultravijolično sevanje ter vnetne in alergijske bolezni, med njimi tudi psoriaza in AD (Nicolaou, 2013). Eikozanoidi, ki izhajajo iz Ω – 3 maščobnih kislin, delujejo protivnetno, medtem ko eikozanoidi, ki izhajajo iz Ω – 6 maščobnih kislin, pospešujejo vnetje (Rosenberg in Asbell, 2010).

Dekozaheksanojska kislina, vstavljeni med membranske fosfolipide, močno vpliva na osnovne membranske značilnosti, kot so fluidnost, elastična stisljivost, prepustnost in aktivnost proteinov (Stillwell in Wassal, 2003).

Velika količina arahidonske in dokozaheksanojske kisline se najaha v tkivih sesalcev. Linolna in linolenska kislina se pri sesalcih ne moreta tvoriti *de novo*, zato sta nujno potrebni sestavini prehrane. N – 3 omega maščobne kisline, posebej eikozapentanojsko in dokozaheksanojsko kislino lahko pridobimo iz maščobe rib in morskih sesalcev, n – 6 maščobne kisline pa se nahajajo v mesu in rastlinskih oljih. Polinenasičene maščobne kisline in njihovi presnovki imajo številne fiziološke vloge, ki vključujejo oskrbo z energijo, strukturo membran, celično sporočanje in urejanje izražanja genov. Polinenasične maščobne kisline so tarča lipidne peroksidacije (Catala, 2010).

V eni od raziskav so preučevali vplive dveh pogostih zdravljenj AD pri ljudeh, in sicer z zaviralcem kalcineurina (pimecrolimus) in glukokortikoidnim hormonom betametazonom. Ugotovili so, da se je hidracija rožene plasti vrhnjice povečala in prekokožna izguba vode zmanjšala pri obeh načinih zdravljenja. Pri zdravljenju s pimecrolimusom so z elektronskim mikroskopom ugotovili bolj urejene lipidne sloje rožene plasti vrhnjice in pravilno iztiskanje lamelarnih teles, kar nakazuje obnovo kožne pregrade, medtem ko je bilo neskladje

zunajceličnih lipidnih dvoslojev po zdravljenju z betametazonom še vedno prisotno, lamelarnih telesca pa so bila le delno napolnjena (Jensen in sod., 2009). Sicer pa sta obe zdravili uredili kožno diferenciacijo in zmanjšali pretirano proliferacijo vrhnjice. Betametason je učinkoviteje zmanjšal klinične znake in proliferacijo vrhnjice, kar je imelo hiter učinek na zmanjšanje prekokožne izgube tekočine. Pri dolgotrajnem zdravljenju z betametazonom je prišlo do prekomernega tanjšanja vrhnjice. Avtorji so zato zaključili, da zdravljenje z glukokortikoidi vodi predvsem v zmanjšanje pritoka krvi in vnetja, kar je ugodno pri kratkotrajnem zdravljenju AD, medtem ko je pimecrolimus bolj primeren za dolgotrajno zdravljenje AD, saj pomaga pri obnovi kožne pregrada in na ta način prepreči vdor okoljskih alergenov v kožo ter posledične imunološke reakcije. Pri uporabi pimecrolimusa ne prihaja do neželenega pojava atrofije vrhnjice (Jensen in sod., 2009). Ponovno vzpostavljanje normalne vloge kožne pregrada s pomočjo dodajanja lipidov ali z zaviranjem proteaz, se zdi smiselen način zdravljenja tudi v primerih, ko je dokazana degeneracija strurnega proteina filagrina. Nove metode zdravljenja pri ljudeh posegajo v uporabo antimikrobnih peptidov in uporabljajo vitamin D₃ ali zaviralce kalcinevrina (Jung in Sting, 2008).

Topikalno zdravljenje kožnih bolezni z oljem vitamina E pri ljudeh je koristno v večini primerov kseroze, hiperkeratoze, asteatotskem ekcemu, AD, površinskih opeklinah, ulkusih kože in onihoshiziji. Učinki tega zdravljenja so minimalni pri psoriazi, lihen planusu, seboroičnem dermatitisu, vitiligu, dishidroznem ekcemu in splošnih infekcijskih boleznih. Skupen dejavnik, ki povezuje vse omenjene bolezni, pri katerih je bil opazen zdravilni učinek olja vitamina E, bi lahko bil nenormalen ali neprimeren odziv na poškodbo in večja ali manjša izguba vloge kožne pregrada. Zdravilni učinek olja vitamina E je lahko posledica kombinacije biološke aktivnosti α-tokoferola in fizikalnega učinka olja. Viskoznost olja omogoča znatno vlaženje kože in zmanjšanje prekokožne izgube vode (Panin in sod., 2004).

V številnih raziskavah pri ljudeh so dokazali vlogo vitamina E kot močnega antioksidanta, ki zmanjšuje obsežnost in pogostost patoloških sprememb v koži, če ga vnašamo s hrano. Poleg vitamina E tudi drugi antioksidanti, kot so vitamin C, beta-karoten, flavonoidi in polifenoli ščitijo organizem pred reaktivnimi kisikovimi spojinami. Kapaciteta zaščitnega antioksidantnega obrambnega sistema pri psih, ki se zelo malo gibajo, je zlahka prekoračena v primeru akutne fizične aktivnosti, pri čemer se zniža fluidnost eritrocitne membrane (angl.

Erythrocyte membrane fluidity, EMF), aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), vitamina E in poviša MDA. Eksogeni antioksidanti, ki jih psi zaužijejo večinoma s hrano ali prehranskimi dopolnili, pripomorejo k preprečevanju OS, vendar pa neprimerna prehrana lahko vodi do povečane dovzetnosti za nastanek oksidativnih poškodb, izzvanih s fizično aktivnostjo pri psih, ki niso vajeni gibanja (Motta in sod., 2009).

Jakost srbeža in izraženost kožnih sprememb lahko zmanjšamo s protivnetnimi zdravili. Na voljo so topikalni in peroralni glukokortikoidi, oralni ciklosporin in topikalni takrolimus. Odmerek zdravil naj bo prilagojen vsakemu pacientu posebej. Na voljo je tudi specifična imunoterapija, kadar so alergeni, na katere je pes preobčutljiv, znani (Olivry in sod., 2010). Alergensko specifična imunoterapija (angl. Allergen-specific immunotherapy; ASIT) je edino zdravljenje, ki lahko spodbudi remisijo AD (Dell in sod., 2012).

Način zdravljenja AD je odvisen od tega, ali je faza AD akutna ali kronična ter od tega, ali so kožne spremembe lokalizirane ali generalizirane. Uspešno zdravljenje vključuje identifikacijo dejavnikov, odgovornih za nastanek bolezni, ter odstranitev le-teh, kadar je to mogoče. Pomembna je preventiva pred nastankom recidivov (Olivry in sod., 2010).

3. MATERIAL IN METODE

3.1 Živali, vključene v raziskavo

V raziskavo je bilo vključenih devetindvajset psov z diagnozo AD in sedemnajst zdravih psov, starih od enega do pet let, različnih pasem in obeh spolov. Trije psi so bili na željo lastnikov izključeni iz raziskave.

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 Uporabljena zdravila

Pse z AD smo z dvojno slepo metodo razdelili v 2 skupini. Prva skupina (skupina vitamin E; 13 psov) je prejemala peroralno antihistaminik *feksofenadin* Telfast® (Aventis pharma Deutschland GmbH, Frankfurt, Nemčija) v odmerku 18 mg/kg t.m. enkrat dnevno, ter antioksidant vitamin E v priporočenem odmerku 8,1 IE/kg t.m. enkrat dnevno (Stein, 2000) v obliki prehrambenega dodatka (olje E-OIL, Natural Wealth, New York, ZDA). Druga skupina (skupina placebo; 13 psov) je poleg *feksofenadina*, v enakem odmerku kot prva skupina, prejemala placebo v obliki mineralnega olja. Psi so prejemali zdravila v obdobju 8 tednov.

3.3 Merjeni parametri živali, vključenih 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 sistema točkovanja CADESI-03. Lastniki so s pomočjo vizualne numerične lestvice ocenjevali stopnjo srbeža. Pri vsakem obisku smo odvzeli ostružke in brise spremenjenih delov kože telesa in sluhovodov za citološko

preiskavo. Pri prvem in zadnjem obisku smo odvzeli tudi biopre spremenjenih delov kože za imunohistokemično določanje 3-NT in iNOS.

3.4 Sistem vrednotenja kliničnih znakov CADESI-03

Kožne spremembe ob vključitvi v raziskavo in vplive zdravljenja na kožo smo klinično vrednotili s sistemom točkovanja CADESI-03 (Olivry in sod., 2007). 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 ni prikazana in je del doktorske naloge A.P. Kapun). Meritve kožnih sprememb 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.

3.5 Ocenjevanje stopnje srbeža

Lastnikom psov smo ob prvem obisku predstavili in obrazložili numerično lestvico 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 obiskoma.

Za oceno srbeža na numerični lestvici 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) (Plevnik Kapun A., 2012).

3.6 Citološka preiskava ostružkov in brisov kože telesa in sluhovodov

Odvzem ostružkov in brisov kože telesa ter brisov kože sluhovodov

Ostružke kože telesa smo odvzeli tako, da smo na spremenjeno, neodlakano kožo nanesli parafinsko olje (Pharmachem s.p., Ljubljana, Slovenija) in vrhnjico postrgali s skalpelom številka 10 (Aesculap, Tuttlingen, Nemčija) do krvavitve. Dobljeni material smo enakomerno nanesli na mikroskopska stekelca. Nativne preparate smo v roku pol ure po odvzemu mikroskopsko pregledali pod 40 - kratno povečavo (Nikon Eclipse Ci, Kingston upon Thames, Velika Britanija). Brise spremenjenih delov kože telesa in sluhovodov smo odvzeli s pomočjo sterilne vatenke (Deltalab, Barcelona, Španija). Po potrebi smo uporabili parafinsko olje, ki smo ga nanesli na kožo in jo s sterilno vatenko podrgnili. Vatenko smo nekajkrat povajali po mikroskopskem stekelcu, preparat fiksirali nad plamenom in pobarvali po metodi Diff Quik^R (Merck, Darmstadt, Nemčija). Preparate smo mikroskopsko pregledali pod 1000 - kratno povečavo (Nikon Microphot – FXA, Kingston upon Thames, Velika Britanija).

Ocenjevanje ostružkov in brisov kože telesa ter brisov kože sluhovodov

Preparate za citološko preiskavo smo ocenjevali kvantitativno glede na prisotnost mikroorganizmov. Vzorce smo pregledali pod mikroskopom (Nikon Microphot – FXA z okularjem 10X CFWN D10X/20). Mikroskop smo povezali z računalniškim ekranom s pomočjo kamere (DS – Fi1). V programu NIS – Elements D3.2 Live quality smo s pomočjo mikroskopskega meritca izmerili velikost vidnega polja na ekranu - širine 84,34 µm in višine 63,17 µm. S pomočjo mikroskopske mreže velikosti 10 X 10 µm smo si pomagali pri natančnejšem štetju celic, tako da smo prešteli celice v vsakem kvadratu mreže. Pod malo – 400 - kratno povečavo smo si ogledali preparat in določili tiste dele preparata, v katerih je bila največja verjetnost, da najdemo povzročitelje okužbe. Ko smo določili značilna mesta, smo na teh pregledali 10 vidnih polj pod 1000 - kratno povečavo z imerzijskim oljem (Objektiv Plan 100x, 160/0,17, 1,25 oil). V vsakem od 10 polj smo prešteli število kokov in kvasovk. Epitelnih celic kože nismo šteli, saj se po podatkih iz literature njihovo število pri zdravih psih in psih obolelih za AD ne razlikuje (Ginel in sod., 2002). Izračunali smo povprečno število mikroorganizmov na vzorec. Za normalne vzorce smo šteli tiste, ki so vsebovali $\leq 0,8$

kvasovk/vidno polje in ≤ 2 koka/vidno polje. Za patološke vzorce smo šteli tiste, ki so vsebovali več kot 2 kvasovki/vidno polje in več kot 10 kokov/vidno polje. Pri posameznem pregledu smo upoštevali povprečno vrednost brisa s področja prsi oziroma dimelj. Dobljene rezultate smo statistično vrednotili.

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

3.7 Imunohistokemična preiskava

Odvzem vzorcev:

Pred odvzemom vzorcev kože smo pse pomirili z hidroklorid medetomidinom (Domitor®, Pfizer animal health, New York, ZDA) z uporabo odmerkov, ki jih priporoča proizvajalec. Za lokalno anestezijo smo uporabili 2% lidokain (Xylocaine®, 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 in zdrave kože smo jemali na področju prsnice in trebuha. Večina odvzetih vzorcev kože je bila uporabljena za določanje vsebnosti vitamina E v sklopu doktorske naloge Plevnik Kapun A., en vzorec prizadete kože pa smo za 24 ur shranili v fiksativu Bouin (Sigma, Taufkirchen, Nemčija). Po 24 urah smo fiksirane vzorce do obdelave hranili v 70% alkoholu (Pharmachem s.p., Ljubljana, Slovenija). Vzorce, shranjene v alkoholu, smo vklopili v parafin po standardnem postopku.

Rezanje vzorcev z mikrotomom:

Parafinske bloke smo najprej pripravili tako, da smo obrezali odvečen parafin. Bloke z vzorčki smo vpeli v mikrotom. Najprej smo rezali rezine, debelejše od 7 μm , da smo prišli do dejanskega vzorčka. Ko smo dosegli primerno globino vzorčka, smo od vsakega odrezali po 2 rezini, debeline 7 μm in ju s pomočjo čopiča dali v kopel z destilirano vodo, segreto na 45°C. Ko so se rezine razvile, smo jih dali na predmetna stekelca, prevlečena z 2% silanom (APES, Sigma). Na eno predmetnico smo dali rezine 3 naključno izbranih vzorčkov. Od vsakega

vzorčka smo naredili 2 rezini, skupno smo dali na predmetnice 6 rezin. Preparate smo zložili v košarico za preparate in jih čez noč pustili v inkubatorju pri temperaturi 40 – 45 °C, da so se posušile.

Pred imunohistokemičnim barvanjem smo preparate pobarvali s hematoksilinom in eozinom (HE) s čimer smo določili globino vzorčka, na kateri je viden epitelij kože.

Optimizacija imunohistokemične metode:

Metodo imunohistokemije smo najprej optimizirali. Naredili smo različne razredčitve primarnih kunčjih protiteles proti 3 - NT in proti iNOS (angl., rabbit anti – iNOS; Millipore) ter izbrali tisto, pri kateri je bilo obarvanje pozitivno.

Imunohistokemično smo določali prisotnost 3 - NT in iNOS.

Za določevanje 3 - NT smo uporabili primarna kunčja protitelesa proti 3 – NT (angl., rabbit anti – nitrotyrosine; Millipore, Temecula, CA, ZDA) v ustreznih razredčitvah (1:1000) in oslovska protikunčja sekundarna protitelesa (angl., donkey anti rabbit; Jackson ImmunoResearch) v ustreznih razredčitvah (1:500).

Za določevanje iNOS smo uporabili primarna kunčja protitelesa proti iNOS (angl., rabbit anti – iNOS; Millipore) v ustreznih razredčitvah (1:100), in oslovska protikunčja biotinizirana sekundarna protitelesa v ustreznih razredčitvah (1:500).

Imunohistokemično barvanje:

1) Prvi del

V prvem delu imunohistokemičnega barvanja smo iz rezin v košarici s ksilenom odstranili parafin, nato smo rezine rehidrirali v 100% etanolu, 96% etanolu in nazadnje v 70% etanolu. V vsaki 200 mL kadički smo košarico pustili 5 minut. Za dokončno rehidracijo smo dali košarico za 5 min v destilirano vodo. Rezine smo nato 5 minut na stresalniku spirali v pufru PBS Tween 20 (Sigma, Taufkirchen, Germany). Nato smo blokirali endogene peroksidaze in sicer tako, da smo dali košarico z rezinami za 20 minut v 200 mL kadičko z 1% H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Nemčija) razredčenega v pufru PBS Tween 20. Rezine smo nato ponovno na stresalniku 5 minut spirali v pufru PBS Tween 20. Predmetnice smo nato vzeli iz košarice in

nanje nanesli normalni oslovski serum (Jackson immunochemicals), s katerim smo preprečili nespecifično vezavo protiteles. Serum smo razredčili 1:5 s pufrom PBS Tween 20. Na vsako predmetnico smo odpipetirali 150 µL seruma. Vzorčke smo 20 minut inkubirali na sobni temperaturi v pokriti škatli za shranjevanje preparatov. Po končani inkubaciji smo s predmetnic odlili serum, z brisačko obrisali odvečno tekočino okrog rezine in nanje nanesli kunčja primarna protitelesa. Za določanje 3 - NT smo uporabili kunčja primarna protitelesa proti nitrotirozinu. Protitelesa smo redčili 1:1000 s pufrom PBS Tween 20. Za določanje iNOS smo uporabili kunčja primarna protitelesa proti iNOS. Protitelesa smo redčili 1:100 s pufrom PBS Tween 20. Na vsako predmetnico smo odpipetirali 150 µL primarnih protiteles. Predmetnice smo pokrili s krovnimi stekelci in jih čez noč inkubirali v hladilniku.

2) Drugi del

V drugem delu imunohistokemičnega barvanja smo predmetnice z rezinami na stresalniku spirali v pufru PBS Tween 20 dvakrat po 5 minut. Med spiranjem so krovna stekelca odpadla. Po spiranju smo s predmetnic odlili odvečno tekočino, z brisačko obrisali tekočino okrog rezin in nanje nanesli oslovska protikunčja biotinizirana sekundarna protitelesa. Protitelesa smo redčili 1:500 s pufrom PBS Tween 20. Na vsako predmetnico smo odpipetirali 150 µL biotiniziranih sekundarnih protiteles. Vzorčke smo 30 minut inkubirali na sobni temperaturi v škatli za shranjevanje preparatov. Po inkubaciji smo vzorčke na stresalniku spirali v pufru PBS Tween 20 dvakrat po 5 minut. Po spiranju smo z brisačko obrisali odvečno tekočino okrog rezin in nanje nanesli kompleks SHRP (streptavidin – hrenova peroksidaza; Jackson immunoresearch). Kompleks SHRP smo redčili 1:500 s Tris pufrom (0,05 M, ph 7,4; Sigma). Na vsako predmetnico smo odpipetirali 150 µL kompleksa SHRP. Predmetnice smo 30 minut inkubirali na sobni temperaturi v škatli za shranjevanje preparatov. Po inkubaciji smo košarico s predmetnicami na stresalniku spirali v Tris pufru dvakrat po 5 minut. Po inkubaciji smo s predmetnic odlili odvečno tekočino in z brisačko obrisali okrog rezin. Na rezine smo s Pasteurjevo pipeto nanesli 0,05 % DAB (angl., diaminobenzidine; Sigma), ki smo ga pripravili tako, da smo 0,005 g DAB dodali v 10 mL Tris pufra. Tuk pred nanosom na predmetnice smo DAB aktivirali z dodatkom 3 µL 30 % H₂O₂. Pod mikroskopom smo preverjali intenziteto obarvanosti. Ko je bila ta zadostna, smo reakcijo prekinili tako, da smo odvečen DAB s predmetnic odlili in predmetnice na stresalniku spirali v destilirani vodi, dvakrat po 5 minut.

Priprava trajnih preparatov:

Predmetnice smo za 15 – 60 sekund potopili v kadičko s hematoksilinom in jih nato 5 minut na stresalniku spirali v vodovodni vodi. Rezine smo nato dehidrirali v naraščajoči vsebnosti alkohola, najprej v 70 % etanolu, nato 96% etanolu in 100% etanolu ter nazadnje v ksilenu. V vsaki kadički smo košarico pustili 5 minut. Na predmetnice smo zatem s hidrofobnim medijem za pripravo trajnih histoloških preparatov (Pertex Medite, Burgdorf, Nemčija) zalepili krovna stekelca velikosti 24 x 40 mm. Trajne preparate smo čez noč posušili na sobni temperaturi.

Pozitivna in negativna kontrola:

Pozitivno kontrolo za določanje 3 – NT smo naredili po navodilih proizvajalca in sicer tako, da smo po hidraciji rezin nanje nanesli pufer 1mM natrijev nitrit (NaNO₂; Sigma), 100 mM natrijev acetat (CH₃COONa; Sigma) in 1 mM H₂O₂. Rezine smo inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi. Nato smo nadaljevali po protokolu.

Kot pozitivno kontrolo za določanje iNOS smo uporabili pozitivno obarvane vzorčke podganje kože, obarvane s kunčjimi primarnimi protitelesi proti iNOS, redčenimi 1:100 s puferom PBS Tween 20.

Negativno kontrolo smo naredili tako, da na rezine nismo nanesli primarnih protiteles.

Priprava digitalnih slik:

Mikroskopske slike smo posneli na mikroskopu Nikon eclipse 80i, opremljenim s kamero Nikon Digital Sight DS – U2 in slike prenesli na računalnik.

Vrednotenje imunohistokemičnega obarvanja:

Preparate z imunohistokemično obarvanim 3 - NT smo ocenjevali kvalitativno glede na intenziteto obarvanosti epitelija kože in v ta namen vzorčke razdelili v štiri skupine, pri čemer smo najmanj intenzivno obarvan epitelij označili s »+« in najbolj intenzivno obarvan epitelij s »++++«.

Preparate z imunohistokemično obarvanim iNOS smo pregledali pod mikroskopom, vendar smo pozitivno obarvane celice zasledili le v manjšem delu vzorcev (naključno razporejenih v skupine), tako da rezultatov imunohistokemičnega barvanja proti iNOS nismo statistično ovrednotili.

3.8 Statistična obdelava podatkov

V statistično analizo so bili vključeni vsi psi, ki so raziskavo zaključili.

Statistično smo vrednotili rezultate skupin psov, zdravljenih s placebom in vitaminom E, posebej za vsak spol.

V statistično analizo je bila vključena obdelava podatkov vseh preiskovanih parametrov psov in sicer stopnja srbeža, obseg kliničnih znakov, število kokov in kvasovk na koži trebuha in v sluhovodih ter stopnja obarvanja 3 – NT z imunohistokemično metodo.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programsko opremo NCSS 2007 (Kaysville, UT, ZDA)

Rezultate zdravljenja smo statistično ovrednotili z enosmerno analizo variance ponavljajočih meritev.

Primerjali smo razlike v merjenih parametrih pri psih, zdravljenih s placebom in vitaminom E pri vsakem od petih pregledov, pri čemer smo kot spremenljivko upoštevali način zdravljenja (vitamin E ali placebo), kot ponavljajočo meritev pa vsakega od 5 pregledov pacientov. Po analizi variance smo razlike med skupinami preverili še s post – hoc Fisherjevim LSD testom. Število kokov in kvasovk na koži smo primerjali tudi med zdravimi psi in psi z AD z enosmerno analizo variance ponavljajočih meritev, pri čemer smo kot spremenljivko upoštevali način zdravljenja (vitamin E ali placebo), kot ponavljajočo meritev pa vsakega od 5 pregledov pacientov. Za primerjavo obsega kliničnih znakov med pacienti, zdravljenimi s placebom in vitaminom E smo naredili dve analizi variance. Prvič smo kot ponavljajočo meritev upoštevali vsakega od petih pregledov pacientov. Drugič smo kot ponavljajočo meritev upoštevali le preglede med zdravljenjem (zadnje štiri preglede). Vsi rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardna napaka.

Pri vseh analizah smo kot statistično zanesljivo upoštevali rezultate, pri katerih je bila vrednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

V raziskavo je bilo vključenih šestinštirideset psov. Devetindvajset psov je imelo diagnozo AD. Ostalih sedemnjst psov je bilo zdravih. Med raziskavo so bili na željo lastnikov, ki niso več želeli sodelovati v raziskavi, izključeni trije psi z AD (številke 11, 14 in 22). Raziskavo je tako zaključilo triinštirideset psov in sicer šestindvajset psov z diagnozo AD in sedemnjst zdravih psov. Statistično smo vrednotili samo vzorce psov, ki so raziskavo zaključili.

Od triinštirideset psov, ki so zaključili raziskavo, je bilo trinajst samic in trinajst samcev z diagnozo AD ter devet zdravih samic in osem zdravih samcev.

Trinajst psov (osem samic in pet samcev) z diagnozo AD je bilo zdravljenih s placebom in trinajst psov (pet samic in osem samcev) z vitaminom E. Obe skupini psov sta prejemali tudi antihistaminik *feksofenadin*.

	PACIENT (oznaka)	STAROST (meseci)	SPOL	PASMA	Tel. teža (kg)
SKUPINA PLACEBO	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
SKUPINA VITAMIN E	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
ZDRAVI	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
	11	13	Ž	GR	18
	12	26	M	ŠAR	60
	13	12	Ž	AT	20
	14	59	Ž	X	38,5
	15	12	Ž	X	21,4
	16	15	M	KE	25,3
	17	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,
KS- 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

Tabela 1: Seznam psov vključenih v raziskavo

4.1 Stopnja srbeža

Stopnja srbeža je bila statistično značilno manjša med zdravljenjem v primerjavi s stopnjo srbeža pred zdravljenjem. Stopnja srbeža pri psih, zdravljenih z vitaminom E, ni pokazala statistično značilnih razlik v primerjavi s stopnjo srbeža pri psih, zdravljenih s placebo.

Analiza stopnje srbeža ni pokazala razlik med spoloma.

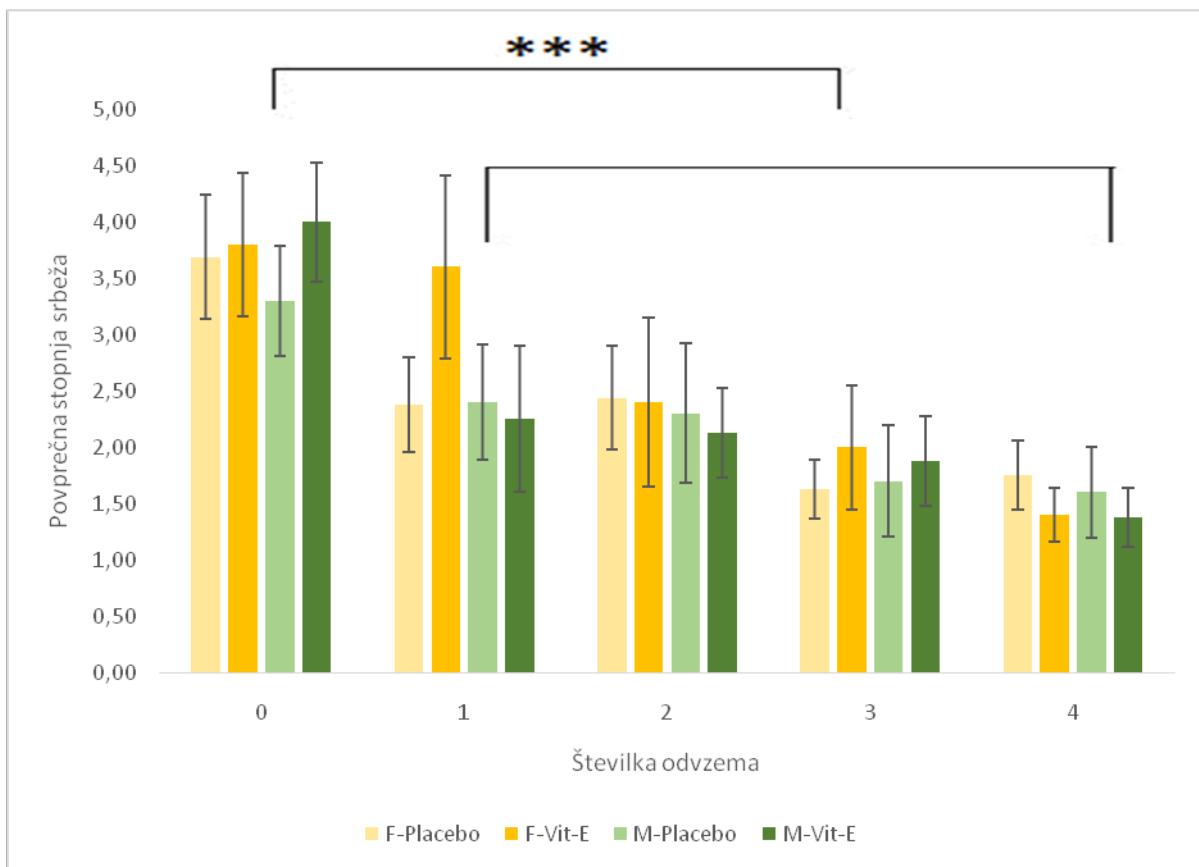


Diagram 1: Primerjava povprečne stopnje srbeža po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placeboom in vitaminom E

Stopnja srbeža je podana glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) stopnje srbeža samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

*** označuje statistično zelo značilno razliko ($p < 0,001$) med stopnjo srbeža pred zdravljenjem (odvzem 0) v primerjavi s stopnjo srbeža med zdravljenjem (odvzem 1 – 4).

Stopnja srbeža je bila manjša med zdravljenjem (odvzem 1 – 4) v primerjavi s stopnjo srbeža pred zdravljenjem (odvzem 0).

4.2 Obseg kliničnih znakov

Obseg kliničnih znakov ocenjen po sistemu vrednotenja kliničnih znakov CADESI-03 je bil statistično značilno manjši med zdravljenjem v primerjavi z obsegom kliničnih znakov pred začetkom zdravljenja.

Analiza primerjave obsega kliničnih znakov psov med zdravljenjem (odvzem 1 – 4), je pokazala statistično značilno manjši obseg kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E v primerjavi z obsegom kliničnih znakov pri psih, zdravljenih s placeboom ($p < 0,05$).

Analiza obsega kliničnih znakov ni pokazala razlik med spoloma.

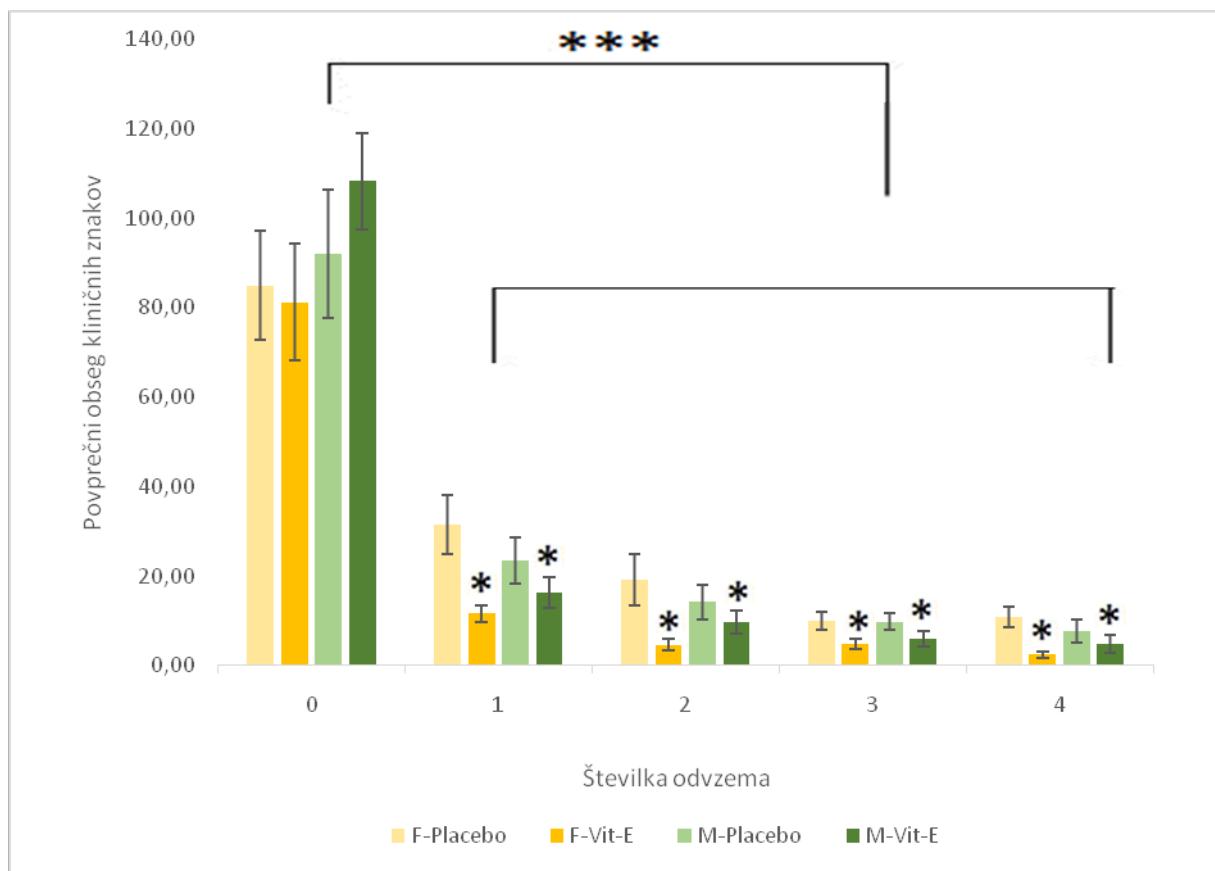


Diagram 2: Primerjava povprečnega obsega kliničnih znakov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placeboom in vitaminom E

Obseg kliničnih znakov je podan glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) obsega kliničnih znakov samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

*** označuje statistično zelo značilno razliko ($p < 0,001$) med obsegom kliničnih znakov psov pred zdravljenjem (odvzem 0) v primerjavi z obsegom kliničnih znakov med zdravljenjem (odvzem 1 – 4). Obseg kliničnih znakov je bil med zdravljenjem (odvzem 1 – 4) manjši v primerjavi z obsegom kliničnih znakov pred zdravljenjem (odvzem 0).

* označuje statistično značilno razliko med skupinama placebo in vitamin E pri primerjavi obsega kliničnih znakov pacientov med zdravljenjem (odvzem 1 – 4). Pri psih, zdravljenih z vitaminom E je bil obseg kliničnih znakov značilno manjši ($p > 0,05$) v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo.

4.3 Število kokov

Število kokov na koži trebuha

Število kokov na koži trebuha pred in med zdravljenjem s placebom in vitaminom E ni bilo statistično različno. Prav tako se število kokov na koži trebuha pri psih, zdravljenih z vitaminom E statistično ni razlikovalo od števila kokov na koži trebuha pri psih, zdravljenih s placebom.

Analiza števila kokov na koži trebuha ni pokazala razlik med spoloma.

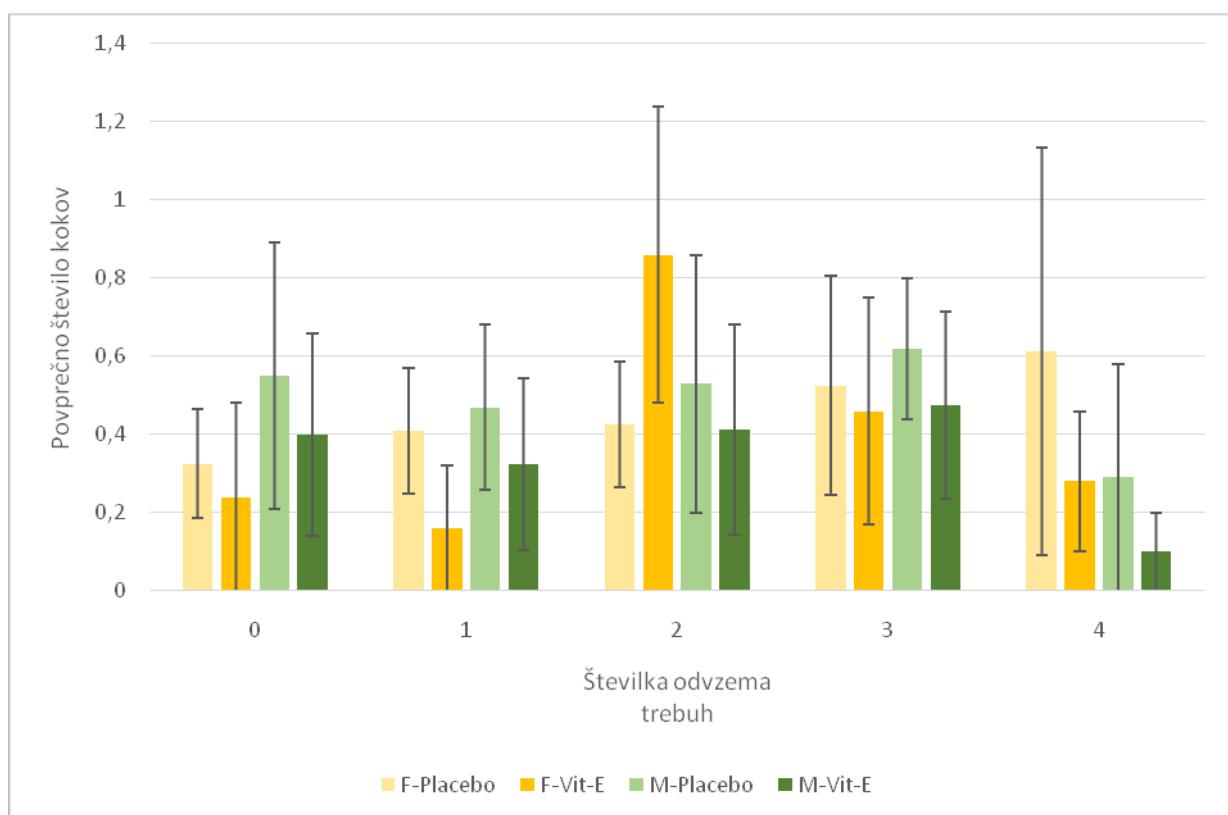


Diagram 3: Primerjava povprečnega števila kokov na koži trebuha psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E

Število kokov na koži trebuha je podano glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) števila kokov na koži trebuha samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

Število kokov v sluhovodih

Število kokov v sluhovodih pred in med zdravljenjem s placebo in vitaminom E ni bilo statistično različno. Prav tako se število kokov v sluhovodih pri psih, zdravljenih z vitaminom E statistično ni razlikovalo od števila kokov v sluhovodih psov, zdravljenih s placebo.

Analiza števila kokov v sluhovodih ni pokazala razlik med spoloma.

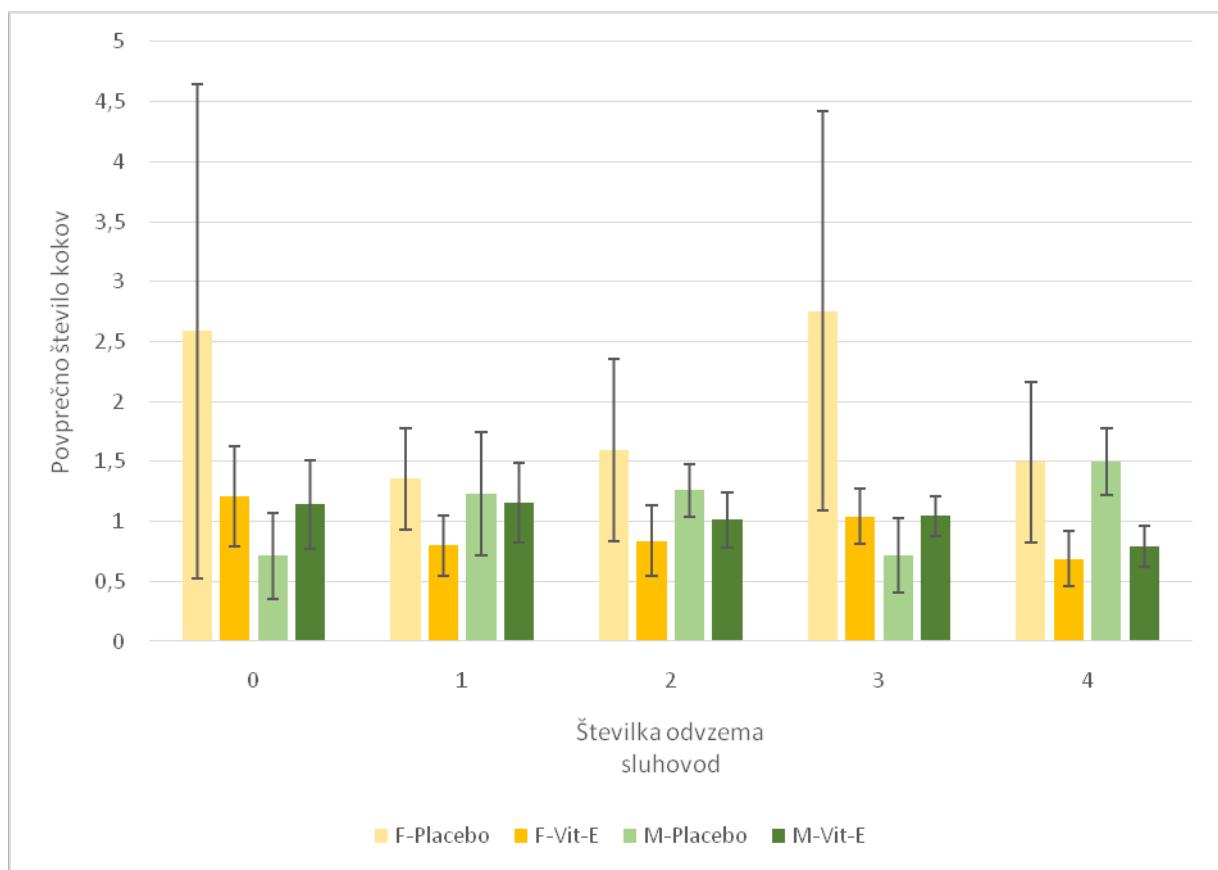


Diagram 4: Primerjava povprečnega števila kokov v sluhovodih psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebo in vitaminom E

Število kokov v sluhovodih je podano glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) števila kokov v sluhovodih samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

4.4 Število kvasovk

Število kvasovk na koži trebuha

Število kvasovk na koži trebuha pred in med zdravljenjem s placebom in vitaminom E ni bilo statistično različno. Prav tako se število kvasovk na koži trebuha pri psih, zdravljenih z vitaminom E, statistično ni razlikovalo od števila kvasovk na koži trebuha pri psih, zdravljenih s placebom.

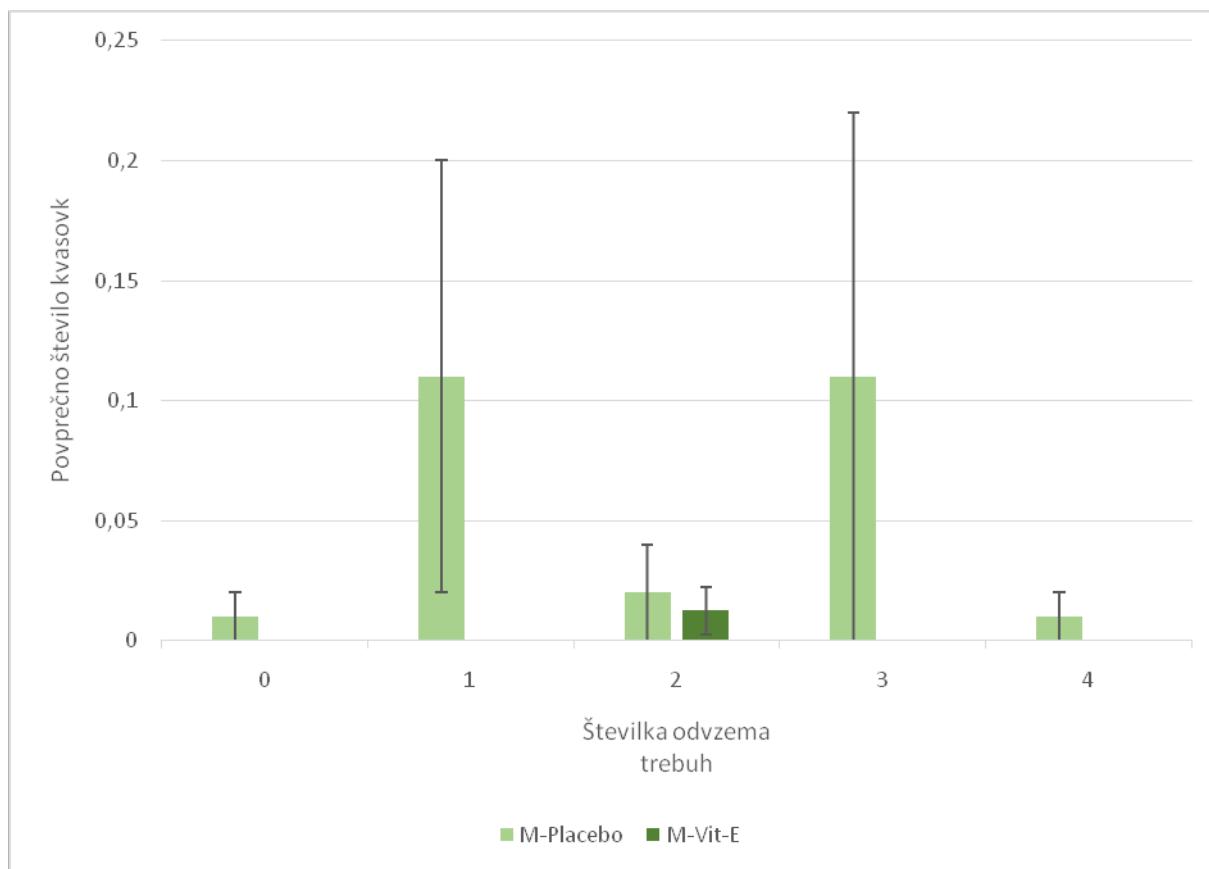


Diagram 5: Primerjava povprečnega števila kvasovk na koži trebuha psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placebom in vitaminom E

Število kvasovk na koži trebuha je podano glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) števila kvasovk na koži trebuha samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

Kvasovke na koži trebuha so se pojavljale le pri samcih. Pri samcih, zdravljenih s placeboom, so bile kvasovke prisotne na koži trebuha pri vseh odvzemih. Pri samcih, zdravljenih z vitaminom E, so bile kvasovke prisotne na koži trebuha samo pri odvzemu številka 2.

Število kvasovk v sluhovodih

Število kvasovk v sluhovodih psov pred zdravljenjem ni bilo statistično različno od števila kvasovk v sluhovodih psov med zdravljenjem s placeboom oziroma vitaminom E. Prav tako se število kvasovk v sluhovodih pri psih, zdravljenih z vitaminom E, statistično ni razlikovalo od števila kvasovk v sluhovodih psov, zdravljenih s placeboom.

Analiza števila kvasovk v sluhovodih ni pokazala razlik med spoloma.

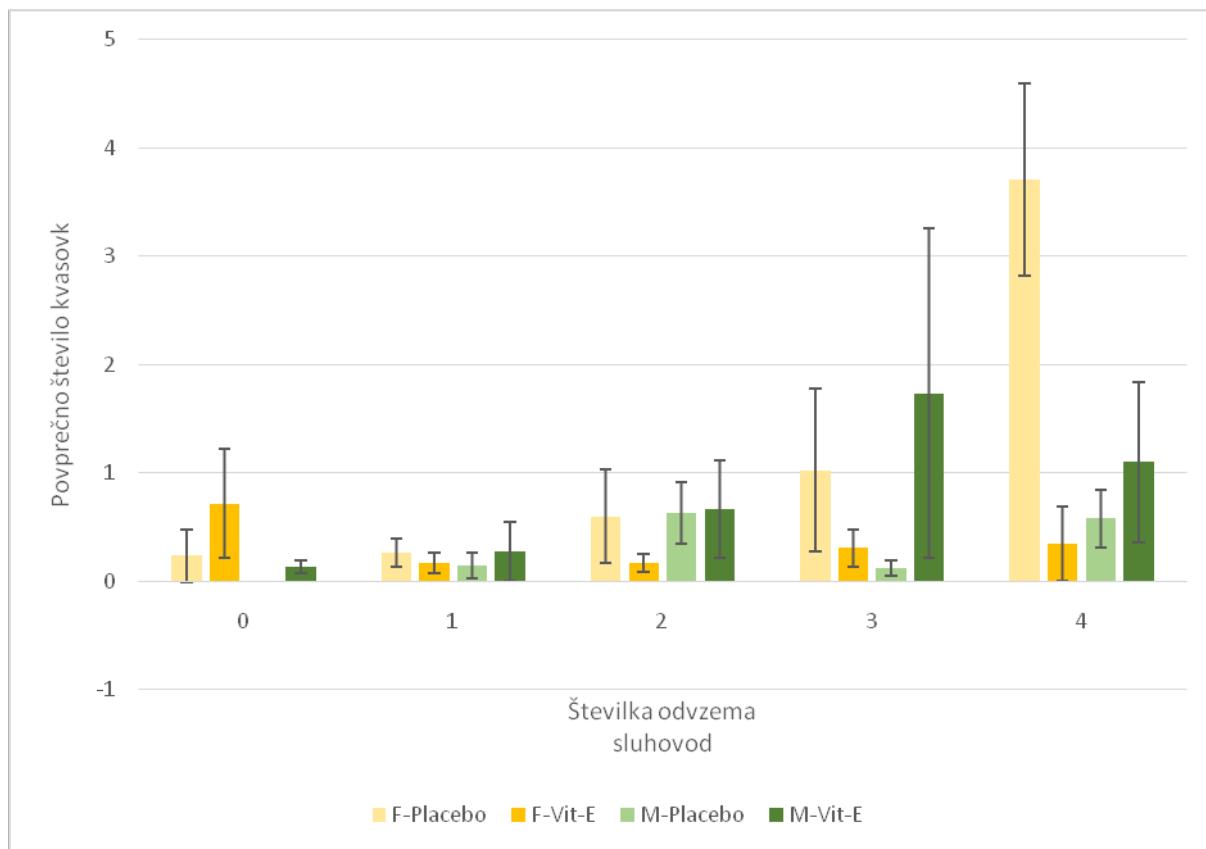
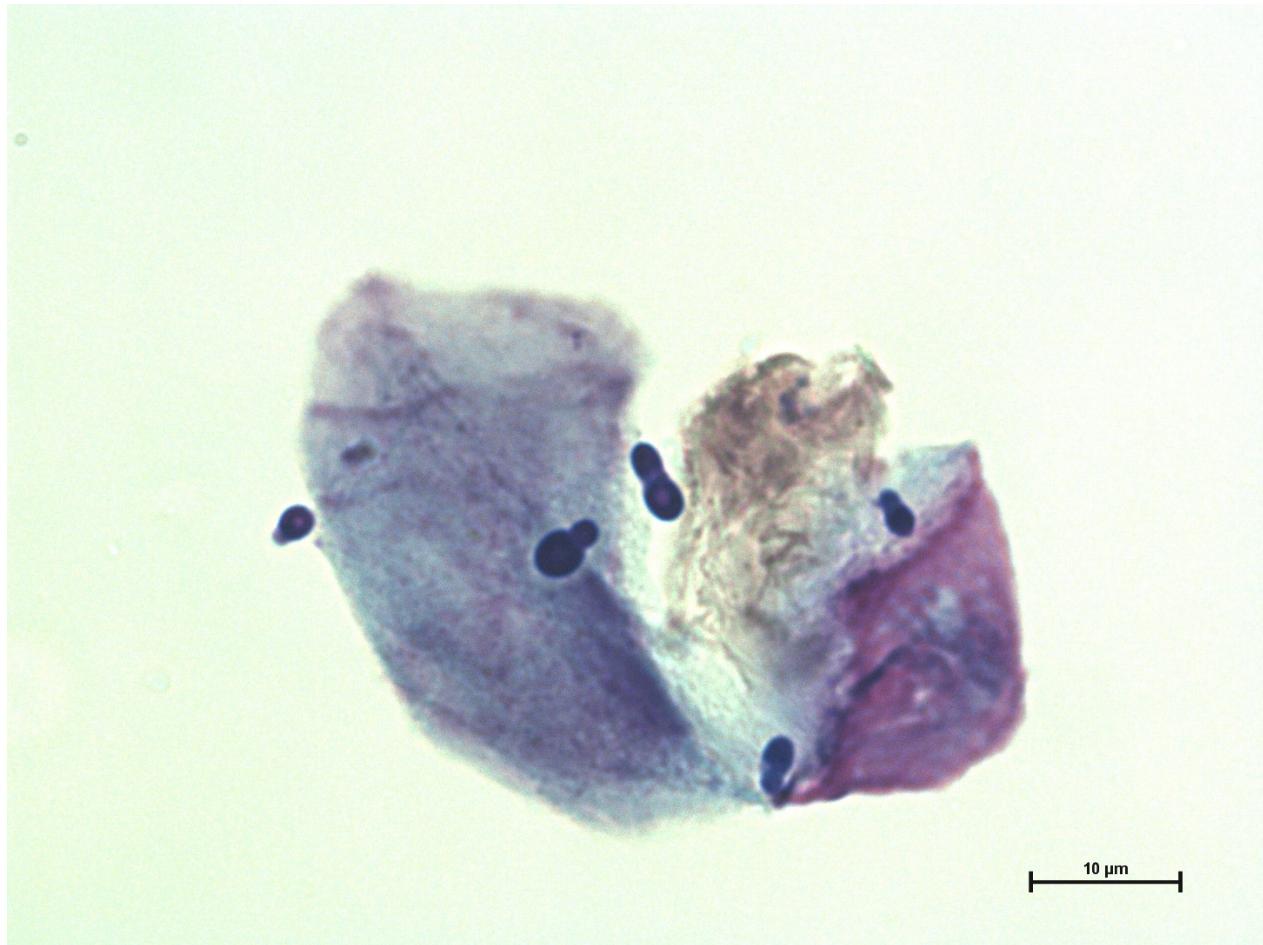


Diagram 6: Primerjava povprečnega števila kvasovk v sluhovodih psov po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in med zdravljenjem (odvzem 1-4) s placeboom in vitaminom E

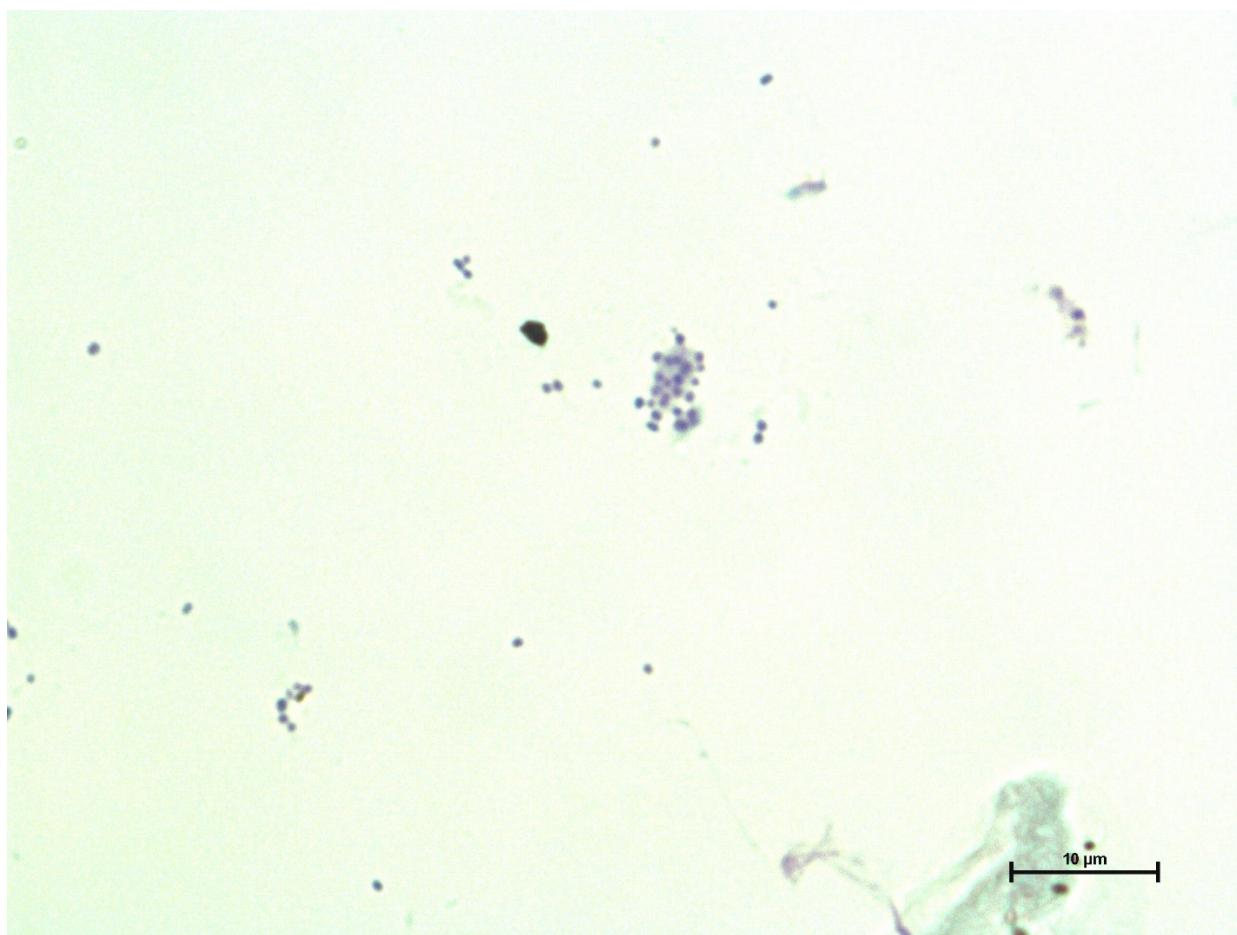
Število kvasovk v sluhovodih je podano glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) števila kvasovk v sluhovodih samic (F) in samcev (M) pri vsakem odvzemu.

Pred zdravljenjem (odvzem 0) ni bilo kvasovk v sluhovodih pri samcih, ki so bili kasneje zdravljeni s placeboom.



Slika 1: Kvasovke s kože sluhovoda

Slika je posneta pod mikroskopom pri 1000 – kratni povečavi.

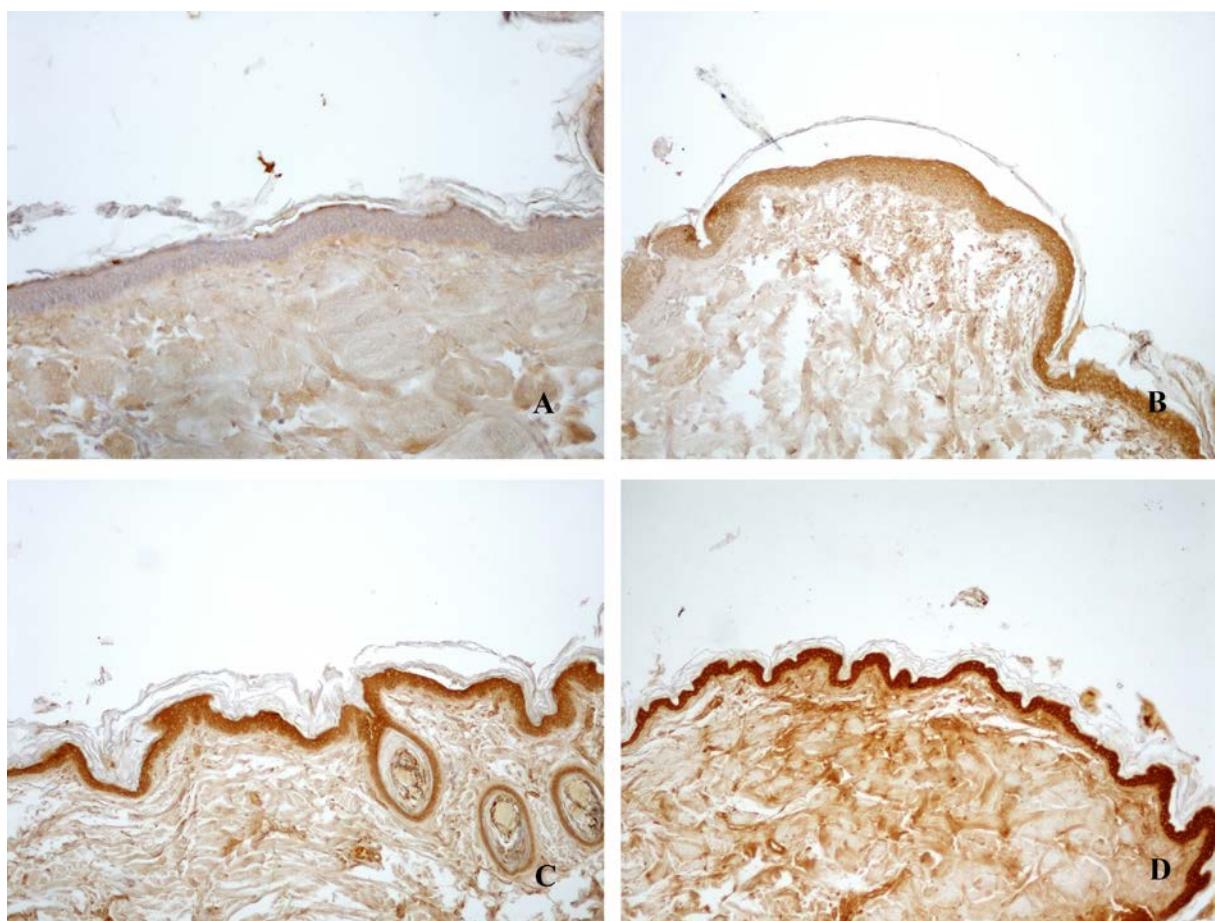


Slika 2: Koki s kože trebuha

Slika je posneta pod mikroskopom pri 1000 – kratni povečavi

4.5 Stopnja obarvanja 3 – NT z imunohistokemično metodo

Preparate z imunohistokemično obarvanim trinitrotirozinom smo ocenjevali kvalitativno mikroskopsko glede na intenziteto obarvanosti epitelija kože in v ta namen vzorčke razdelili v štiri skupine, pri čemer smo najmanj intenzivno obarvan epitelij označili s » + « in najbolj intenzivno obarvan epitelij s » ++++ «.



Slika 3: Različne kvalitativno ocnjene stopnje imunohistokemičnega obarvanega 3 - NT v epiteliju kože

Slika je posneta pod mikroskopom pri 200 – kratni povečavi

Slika A predstavlja najmanj intenzivno obarvan epitel iz prve skupine vzorcev, ki smo ga označili s » + «

Slika B predstavlja manj intenzivno obarvan epitel iz druge skupine vzorcev, ki smo ga označili s » ++ «

Slika C predstavlja bolj intenzivno obarvan epitel iz tretje skupine vzorcev, ki smo ga označili s »+++«

Slika D predstavlja najbolj intenzivno obarvan epitel iz četrte skupine vzorcev, ki smo ga označili s »++++«

Stopnja obarvanja 3 – NT z IHC je bila ob koncu zdravljenja (odvzem 4) manjša v primerjavi s stopnjo obarvanja pred zdravljenjem (odvzem 0). Razlika je bila na meji statistične zanesljivosti ($p = 0,050066$).

Stopnja obarvanja 3 – NT z IHC se pri psih, zdravljenih z vitaminom E, statistično ni razlikovala od stopnje obarvanja 3 – NT z IHC pri psih, zdravljenih s placebom.

Analiza stopnje obarvanja 3 – NT z IHC ni pokazala razlik med spoloma.

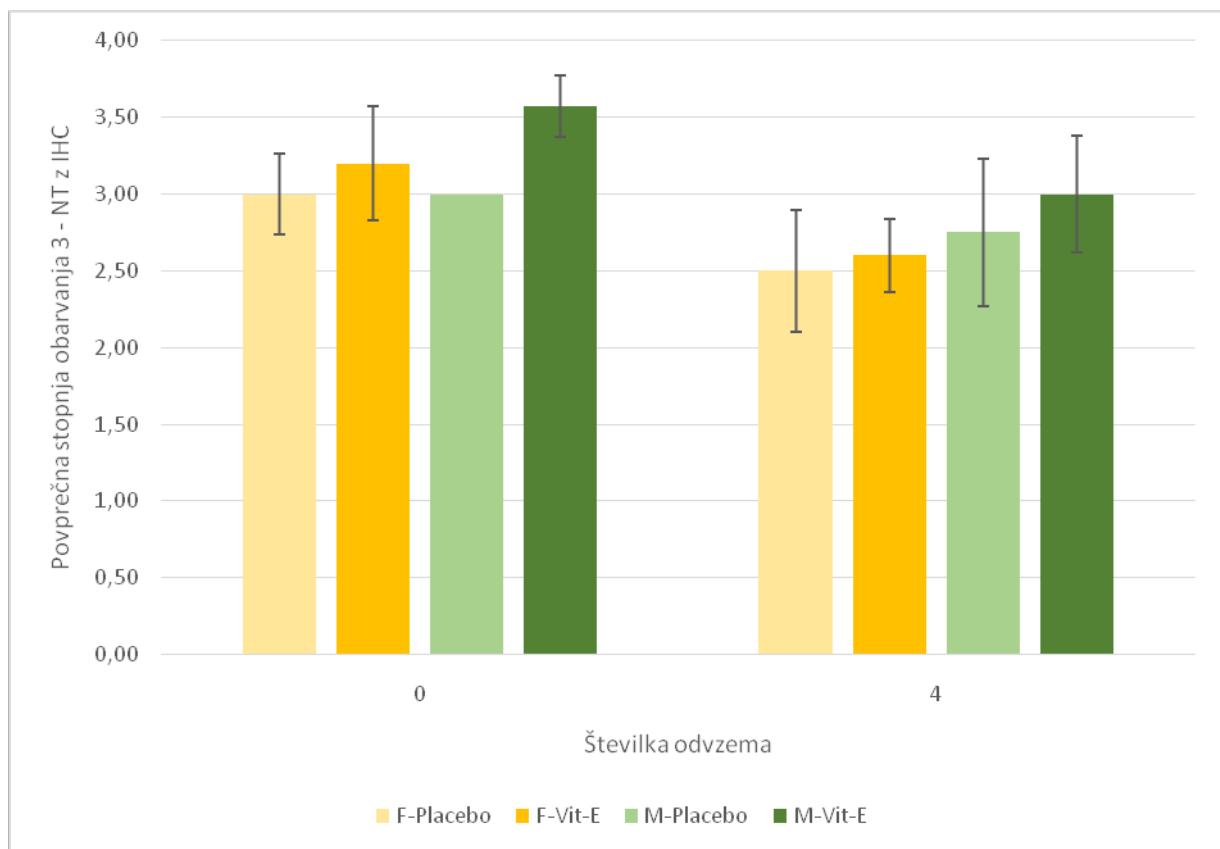


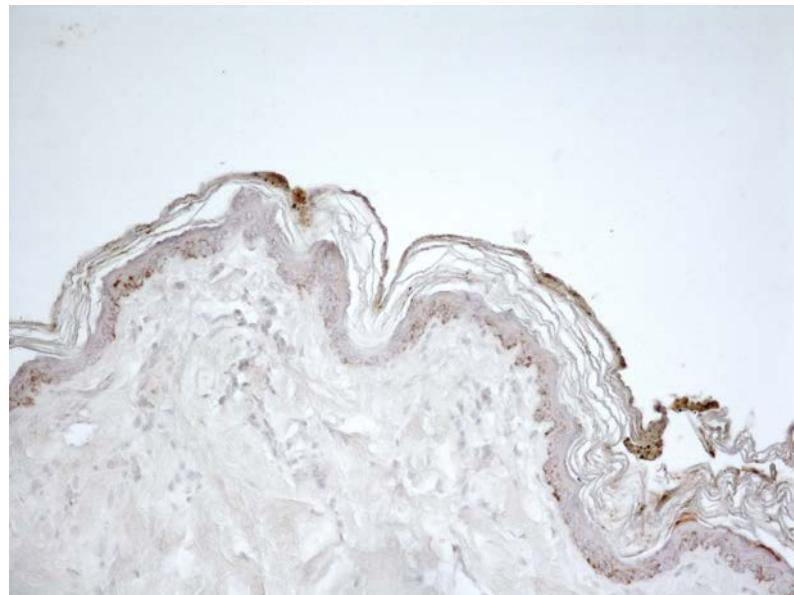
Diagram 7: Primerjava stopnje obarvanja 3 - NT z IHC po spolu pred zdravljenjem (odvzem 0) in ob koncu zdravljenja (odvzem 4) s placebom in vitaminom E

Vzorčki bioptov kože za imunohistokemično določanje 3 – NT so bili odvzeti dvakrat – pred zdravljenjem (odvzem 0) in ob koncu zdravljenja (odvzem 4).

Stopnja obarvanja 3 – NT z IHC je podana glede na aritmetično sredino (\pm standardna napaka) stopnje obarvanja 3 – NT z IHC samic in samcev pri prvem in drugem odvzemu.

4.6 Stopnja obarvanja iNOS z imunohistokemično metodo

Preparate z imunohistokemično obarvanim encimom iNOS smo pregledali pod mikroskopom, vendar smo pozitivno obarvane celice zasledili le v manjšem delu vzorcev (naključno razporejenih v skupine), tako da rezultatov imunohistokemičnega barvanja proti iNOS nismo statistično ovrednotili.



Slika 4: Imunohistokemično obarvan iNOS v epiteliju kože

Slika je bila posneta pod mikroskopom pri 400 – kratni povečavi

5. RAZPRAVA

5.1 Stopnja srbeža

V naši raziskavi smo zmanjševanje stopnje srbeža ugotavljali na podlagi ocen stopnje srbeža, ki so jih lastniki psov določili s pomočjo numerične lestvice za oceno srbeža. Ugotovili smo statistično značilno manjšo stopnjo srbeža med zdravljenjem v primerjavi s stopnjo srbeža pred zdravljenjem pri obeh skupinah psov, vendar pa ni bilo statistično značilnih razlik med psi, zdravljenimi z vitaminom E, v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo.

Obe skupini psov sta v raziskavi poleg vitamina E ali placebo prejemali tudi antihistaminik feksofenadin. Stopnja srbeža se je znižala pri obeh skupinah psov, vendar pa med skupinama razlik v stopnji srbeža nismo ugotovili, zato lahko rezultate pripisemo zdravljenju psov z antihistaminikom feksofenainom in ne zdravljenju z vitaminom E. Antihistaminiki namreč zavirajo delovanje histamina in tako zmanjšujejo srbež in vnetje kože.

Rezultati naše raziskave se ujemajo z ugotovitvami raziskave, narejene na tridesetih psih, kjer so avtorji ugotavljali učinek antihistaminika feksofenadina v primerjavi z metilprednizolonom pri zdravljenju AD psov. Avtorji so ugotovili statistično značilno manjšo stopnjo srbeža pri psih med zdravljenjem s feksofenadinom v primerjavi s stopnjo srbeža pri psih pred zdravljenjem s feksofenadinom (Plevnik in sod., 2009).

Močan vpliv antihistaminika feksofenadina v naši raziskavi bi morda lahko tudi zamaskiral vpliv vitamina E na zmanjšanje stopnje srbeža.

Negativni rezultat (stopnja srbeža se ni razlikovala med skupino vitamin E in skupino placebo) bi lahko bil tudi posledica subjektivnosti lastnikov psov pri ocenjevanju stopnje srbeža. Prav tako bi bil lahko negativni rezultat posledica kratkega trajanja raziskave. Če bi zdravljenje psov z AD trajalo dlje časa, bi morda ugotovili vpliv vitamina E na znižanje stopnje srbeža, kot to v svoji raziskavi pri ljudeh navaja Tsoureli s sodelavci (Tsoureli – Nikita in sod., 2002). V tej raziskavi so avtorji ugotovili, da je prenehanje srbeža pri ljudeh z AD, zdravljenih z vitaminom E, vzrok za zmanjšanje kožnih poškodb.

V našo raziskavo nismo vključili vpliva letnih časov in bivalnih pogojev na potek in zdravljenje AD pri psih. Temperatura, vlaga in zračnost v okolju lahko vplivata na občutljivost in dozvetnost kože na alergene iz okolja, ki lahko vodijo v nastanek AD. V našo raziskavo je bilo vključenih štiriindvajset različnih pasem. Različne pasme psov so različno nagnjene k določenim boleznim. Prav tako bi raznolikost pasem lahko vplivala na različen potek bolezni in odziv na zdravljenje AD. Z raziskavo ene pasme ali manjšega števila pasem psov bi bili morda rezultati raziskave bolj primerljivi.

5.2 Obseg kliničnih znakov

V naši raziskavi smo zmanjševanje obsega kliničnih znakov ocenjevali z zmanjševanjem prisotnosti in intenzitete rdečine kože, lihenifikacije, ekskoriacije in neodlakanosti.

Ugotovili smo statistično zelo značilen manjši obseg kliničnih znakov med zdravljenjem v primerjavi z obsegom kliničnih znakov pred zdravljenjem pri obeh skupinah psov. Ker sta obe skupini psov poleg placebo ali vitamina E prejemali tudi antihistaminik feksofenadin, lahko rezultate pripisemo zdravljenju z antihistaminikom feksofenadinom in ne zdravljenju z vitaminom E. Rezultati naše raziskave potrjujejo ugotovitve raziskave, kjer so trideset psov z AD zdravili s feksofenadinom in njegove učinke primerjali z učinki metilprednizolona. Avtorji so ugotovili statistično značilno manjši obseg kliničnih znakov AD pri psih med zdravljenjem s feksofenadinom v primerjavi z obsegom kliničnih znakov pri psih pred zdravljenjem s feksofenadinom. Ugotovili so, da sta obe omenjeni zdravili zmanjšali obseg kliničnih znakov, vendar je feksofenadin v primerjavi z metilprednizolonom za navedeni učinek potreboval daljši čas (Plevnik in sod., 2009).

Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov pred in med zdravljenjem, smo ugotovili trend proti statistični zanesljivosti, ki se je pokazal v manjšem obsegu kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E, v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo.

Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov med zdravljenjem (odvzemi 1 do 4 brez odvzema 0; pred zdravljenjem) pa je bil obseg kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z

vitaminom E v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo, statistično značilno manjši, kar kaže tudi na vpliv vitamina E na uspešnost zdravljenja AD.

Ker podobne raziskave na psih še niso bile narejene, lahko te rezultate primerjamo le z raziskavami pri ljudeh.

V raziskovah pri ljudeh so dokazali vlogo vitamina E kot močnega antioksidanta, ki zmanjšuje obsežnost in pogostost patoloških sprememb v koži, če ga vnašamo s hrano. Vitamin E pri povišani koncentraciji zmanjšuje možnost nastanka AD pri ljudeh (Oh in sod., 2010). Pri ljudeh z AD so v roženi plasti vrhnjice dokazali povišano vrednost α -tokoferola (vitamina E) in za kar 25% znižane vrednosti lipidne peroksidaze, kar avtorji razlagajo z antioksidantnim delovanjem vitamina E. Kronično vnetje s subkliničnim potekom AD naj bi prispevalo k spodbujanju antioksidantnih mehanizmov in tako povečalo koncentracijo vitamina E v roženi plasti vrhnjice. V navidezno zdravi koži ljudi z AD naj bi bila torej povečana koncentracija vitamina E in zmanjšana koncentracija lipidnih peroksidaz v koži posledica odziva na kronično vnetje (Antille in sod., 2002). Raziskava pri ljudeh je tudi pokazala, da ima topikalna in oralna uporaba vitamina E protitumorni, fotoprotективni učinek in da stabilizira delovanje kožne pregrade (Thiele in SEKANAYAKE – MUDIYANSELAGE, 2007).

V večini primerov kožnih bolezni pri ljudeh je dokazano, da je topikalno zdravljenje z oljem vitamine E učinkovito. Povečana vlažnost kože in zmanjšana prekokožna izguba vode sta posledici viskoznosti olja (Panin in sod., 2004).

Pri ljudeh so bile opravljene številne raziskave o vplivu peroralnega ali topikalnega zdravljenja AD z vitaminom E. V nekaterih raziskovah poročajo o izboljšanju kliničnih znakov kot posledica zdravljenja z vitaminom E. V naši raziskavi smo pse z AD zdravili s peroralnim dajanjem vitamina E. Ugotovili smo manjši obseg kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E, v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebo. Rezultati so pokazali trend proti statistični zanesljivosti. Statistično značilna razlika v obsegu kliničnih znakov pa se je pokazala, ko smo primerjali obseg kliničnih znakov psov med zdravljenjem. V nadaljnje raziskave bi bilo primerno vključiti vpliv peroralnega zdravljenja hkrati s topikalnim zdravljenjem z vitaminom E ter vpliv pasemskih razlik, letnih časov oz. dejavnikov okolja (kot so temperatura, vlaga, zračnost) na nastanek in odziv na zdravljenje AD.

5.3 Število kokov in kvasovk na koži psov z atopičnem dermatitisom

Vneta koža psov z AD je pogosto naseljena s koki, ki s svojim delovanjem stopnjujejo klinične znake AD (Mason in Lloyd, 1989). Koki so del normalne mikroflore pasje kože, pojavljajo se na koži telesa in sluhovodov zdravih in bolnih psov (Stepanović in sod., 2001; May in sod., 2012).

V preteklosti so potekale raziskave, ki so dokazale večjo prisotnost kokov pri bolnih psih z AD v primerjavi z zdravimi psi. Pri primerjavi vezave kokov na keratinocite zdravih psov in psov obolelih za AD, primarno serborejo ali bakterijsko piodermijo so ugotovili, da se koki raje vežejo na keratinocite psov z AD, kot na keratinocite zdravih psov in psov z drugimi boleznimi kože (McEwan, 2000; McEwan in sod., 2005). Po zdravljenju AD se klinični znaki zmanjšajo. Zmanjša se tudi vezava kokov na keratinocite (Harvey in Noble, 1994).

V preteklosti so potekale tudi raziskave o prisotnosti kvasovk (predvsem vrste *Malassezia pachydermatis*) na koži zdravih in bolnih psov. Ugotovili so, da je ta kvasovka redno prisotna na dlakah in v sluhovodih zdravih psov in mačk (Bond in sod., 2000; Nardoni in sod., 2005). *M. pachydermatis* je znana kot pogojno patogena gliva, saj je bila izolirana pri več vrstah sesalcev, ki so obolevali za različnimi dermatozami (Äkerstedt in Vollset, 1996). Posebno vlogo igra pri AD psov. Podobno kot koki kvasovka pripomore k poslabšanju stanja kože (Mason in Lloyd, 1989). Pri psih z AD se *M. pachydermatis* v večji meri nahaja med prsti, v sluhovodih, na področju zadnjika in dimelj. Zanimivo je, da niso našli povezave med obsegom poškodb na koži in visokim številom kvasovk. Pri psih z AD so celo odkrili veliko število kvasovk iz rodu *Malassezia* na področjih navidezno zdrave kože (Nardoni in sod., 2007). V eni od raziskav so preiskovali AD pri 91 psih in ugotovili prisotnost *M. pachydermatis* le pri 2 pacientih (Saridomichelakisa in sod., 1999). Torej ni vsak pes, pri katerem ugotovimo prisotnost *M. pachydermatis* v povečanem številu, atopičen in nima vsak pes z AD na koži povečanega števila *M. pachydermatis* (DeBoer in Marsella, 2001).

V naši raziskavi smo število kokov in kvasovk v brisih kože ocenjevali kvantitativno s citološko preiskavo. Vzorce kože smo jemali s spremenjenih delov kože trebuha in sluhovoda.

Ugotovili smo, da število kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov pred in med zdravljenjem s placeboom in vitaminom E ni bilo statistično različno. Prav tako se število kokov in kvasovk na koži trebuha in v sluhovodih pri psih, zdravljenih z vitaminom E, statistično ni razlikovalo od števila kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov psov, zdravljenih s placeboom. Ugotovili smo sicer manjša nihanja v številu kokov in kvasovk med obema skupinama, vendar niso bila statistično značilna. Rezultate smo pripisali dejству, da so koki in kvasovke pogojno patogeni mikroorganizmi, ki se pojavljajo na koži in v sluhovodih tako pri zdravih psih kot pri psih z AD. V raziskavi smo (brez statistične analize) primerjali tudi število kokov in kvasovk pri psih z AD s številom kokov in kvasovk zdravih psov. Razlik nismo ugotovili. Vendar pa v raziskavi nismo ugotavljali razlik v številu kokov in kvasovk med spremenjenimi in na videz zdravimi deli kože. Glede na dejstvo, da so koki in kvasovke prisotni na koži in v sluhovodih zdravih psov in psov z AD, razlik morda tudi v tem primeru ne bi ugotovili. Nardoni s sodelavci (Nardoni in sod., 2007) navaja celo večje število kvasovk iz rodu *Malassezia* na področjih kože brez poškodb kot na spremenjenih delih kože pri psih z AD.

5.4 Imunohistokemično barvanje

Pri AD pride do intenzivne infiltracije limfocitov in eozinofilnih granulocitov v kožo. Ti sproščajo pro-vnetne citokine, ROS ter encime, ki katalizirajo nastajanje velikih količin RNS. Eden izmed teh encimov je iNOS (ter Steege in sod., 1997). Dušikov oksid škodljivo deluje zaradi reakcije s superoksidnim anionom, s katerim tvori peroksinitrit, ki deluje močno oksidativno in nitracijsko (Calvisi in sod., 2004). Pri reakciji peroksinitrita z beljakovino tirozin nastaja 3 – NT, ki je pogosto merjen označevalec nastajanja RNS *in vivo*. Prosti radikali imajo namreč prekratko življensko dobo, da bi jih lahko merili neposredno, zato običajno merimo produkte, ki nastanejo v reakcijah s prostimi radikali in na ta način ocenujemo OS (Girault in sod., 2001, Tanaka in sod., 1997, Beal, 2002, Radabaugh in sod., 2008). Raziskave kažejo, da prosti radikali povečujejo vsebnost 3 – NT v urinu podgan (Abu-Qare in sod., 2001).

Nitracija tirozina je pogosta v številnih proteinih, organih in bolezenskih stanjih. Nizke koncentracije prostega in na protein vezanega 3 - NT, ki kažejo na nizko stopnjo oksidacijskih

in nitracijskih produktov, so prisotne v normalnih pogojih. V bolezenskih stanjih, povezanih z OS, kot so vnetna obolenja, nevrodegenerativna, kardiovaskularna in druga obolenja, je koncentracija 3 - NT pri ljudeh značilno povišana (Souza in sod., 2008).

V eni od raziskav so ugotavljeni vpliv NO in RNS na razvoj kožnih poškodb, značilnih za AD pri NC/Nga miših, ki predstavljajo živalski model za preučevanje AD pri ljudeh. Ugotovili, so, da sta bila nastajanje RNS v eozinofilnih granulocitih in neravnovesje v metabolizmu NO vpletena v patogenezo kožnih poškodb pri NC/Nga miših. Koncentracija 3 – NT, vezanega na proteine, je bila značilno povišana v kožnih poškodbah pri NC/Nga miših z AD. Imunohistokemično je bila prisotnost 3 – NT izražena v skoraj vseh eozinofilnih granulocitih (Kubo in sod., 2005).

V številnih raziskavah so z imunohistokemičnim barvanjem ugotavljeni vsebnost 3 – NT kot označevalca oksidativnega stresa. Vendar nikjer v literaturi nismo zasledili raziskav o vplivu zdravljenja z vitaminom E na imunohistokemične parametre oksidativnega stresa pri psih z AD.

V naši raziskavi smo biopte kože odvzeli pri prvem in zadnjem obisku in jih na podlagi imunohistokemičnega barvanja 3 – NT in iNOS kvalitativno ocenjevali pod mikroskopom glede na stopnjo obarvanja epitelija kože (preparatov z imunohistokemično obarvanim iNOS nismo statistično ovrednotili).

Ugotovili smo manjšo stopnjo obarvanja 3 – NT z IHC po zdravljenju v primerjavi s stopnjo obarvanja pred zdravljenjem pri obeh skupinah psov. Razlika je bila na meji statistične zanesljivosti. Vendar pa se stopnja obarvanja 3 – NT z IHC pri psih, zdravljenih z vitaminom E, statistično ni razlikovala od stopnje obarvanja 3 – NT z IHC psov, zdravljenih s placebom. Ker je bilo obarvanje 3 – NT z IHC po zdravljenju manjše pri obeh skupinah psov, razlik ne moremo pripisati vplivu vitamina E.

5.5 Vpliv spola na vpliv zdravljenja AD z vitaminom E

V številnih raziskavah so proučevali vpliv spola na nastanek AD, vendar so rezultati raziskav nekonsistentni (Griffin. in DeBoer, 2001). V nekaterih raziskavah so ugotavljalji večjo predispozicijo za nastanek AD pri samicah. Tako so v eni od raziskav pri ljudeh npr. ugotavljalji vpliv vitamina E na klinične znake in koncentracijo IgE v serumu in ugotovili, da je v skupinah, zdravljenimi s placebom in vitaminom E, AD manj napredoval pri ženskah kot pri moških. Več žensk kot moških je prešlo v popolno remisijo (Tsoureli – Nikita in sod., 2002). V drugih raziskavah so večjo predispozicijo za nastanek AD pripisali samcem, nekatere raziskave pa niso pokazale vpliva spola na nastanek AD (Griffin. in DeBoer, 2001).

V naši raziskavi smo v statistično analizo vključili obdelavo podatkov vseh preiskovanih parametrov psov in sicer stopnjo srbeža, obseg kliničnih znakov, število kokov in kvasovk na koži trebuha in v sluhovodih ter stopnjo obarvanja 3 – NT z imunohistokemično metodo. Analize smo naredili skupno za oba spola in posebej za vsak spol, vendar pri nobenem od preiskovanih parametrov nismo ugotovili razlik med spoloma.

Rezultati več raziskav, v katerih so proučevali vpliv spola na nastanek AD, so zelo različni. V našo raziskavo so bili vključeni kastrirani in nekastrirani samci ter sterilizirane in nesterilizirane samice. Rezultati vpliva zdravljenja AD z vitaminom E bi bili zagotovo bolj primerljivi, če bi bili v raziskavo vključene zgolj nekastrirane oz. nesterilizirane živali ali zgolj sterilizirane oziroma kastrirane živali, saj imajo tudi spolni hormoni pomemben vpliv na kožo. Estrogeni in androgeni hormoni so odgovori za višjo stopnjo delitev celic v bazalnem delu vrhnjice. Poleg tega estrogeni posredno povečajo tvorbo hialuronske kisline, ki koži pomaga ohranjati vlago. Androgeni pa povečujejo nastajanje kolagena, kar se odraža v večji odpornosti kože na zunanje vplive, zato bi tako estrogeni kot androgeni lahko imeli vpliv na potek AD, ki pa bi bil lahko v naši raziskavi zakrit zaradi individualnih razlik med psi, ki so bili vključeni v raziskavo.

6. SKLEPI

V naši raziskavi nismo ugotovili bistvenega vpliva dodajanja vitamina E na število kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov psov.

Stopnja srbeža se je znižala pri obeh skupinah psov. Rezultate smo pripisali zdravljenju psov z antihistaminikom feksofenadinom in ne zdravljenju z vitaminom E.

V naši raziskavi se je obseg kliničnih znakov pri psih ves čas zdravljenja zmanjševal. Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov pred in med zdravljenjem smo ugotovili trend proti statistični zanesljivosti, ki se je pokazal v manjšem obsegu kliničnih znakov pri psih, zdravljenih z vitaminom E v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebom.

Pri analizi primerjave obsega kliničnih znakov psov med zdravljenjem (odvzemi 1 – 4) pa se je obseg kliničnih znakov statistično značilno zmanjšal pri psih, zdravljenih z vitaminom E, v primerjavi s psi, zdravljenimi s placebom. Rezultate zato lahko deloma pripišemo tudi vplivu zdravljenja z vitaminom E.

Stopnja obarvanja 3 – NT z IHC pri psih, zdravljenih z vitaminom E se statistično ni razlikovala od stopnje obarvanja 3 – NT z IHC psov, zdravljenih s placebom.

V naši raziskavi razlik med spoloma pri poteku in značilnostih AD psov nismo ugotovili.

Z raziskavo smo ovrgli hipotezo, da ima zdravljenje AD z vitaminom E vpliv na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemično obarvanega 3 – NT. Hipotezo, da je uporaba vitamina E smiselna pri zdravljenju atopičnega dermatitisa pri psih, smo deloma potrdili, deloma ovrgli, saj ima pri primerjavi obsega kliničnih znakov pacientov med zdravljenjem, zdravljenje z vitaminom E vpliv na izboljševanje kliničnih znakov psov z AD, vendar pa ne vpliva na znižanje stopnje srbeža in na manjše število kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov psov.

7. POVZETEK

Oksidativni stres je vpletен в patogenezo AD pri ljudeh in psih. Številne raziskave pri ljudeh in psih so dokazale vpliv delovanja antioksidantov na zmanjševanje patoloških sprememb v koži. V naši raziskavi smo žeeli ugotovili, ali antioksidant vitamin E vpliva na zmanjšanje parametrov oksidativnega stresa pri psih z AD in ali je uporaba vitamina E učinkovita in smiselna pri zdravljenju AD pri psih. V raziskavo so bili vključeni zdravi psi in psi z diagnozo AD. Psi z AD so bili dvojno slepo razdeljeni v dve skupini. Obe skupini psov sta prejemali antihistaminik *feksofenadin*, ena skupina psov je poleg antihistaminka prejema placebo, druga skupina psov pa je poleg antihistamika prejema vitamin E. V obdobju 8 tednov smo petkrat ocenjevali klinične spremembe na koži psov in srbež. Pri vsakem obisku smo odvzeli tudi ostružke in brise kože telesa in sluhovodov za citološko preiskavo. Biopse za imunohistokemično določanje 3-NT in iNOS smo odvzeli pri prvem in pri zadnjem obisku. V naši raziskavi smo ugotovili pozitiven vpliv vitamina E na manjši obseg kliničnih znakov pri psih z AD. Manjši obseg kliničnih znakov je bil statistično značilen pri primerjavi obsega kliničnih znakov psov med zdravljenjem (pregledi 1-4). Stopnja srbeža je bila statistično zmanjšana. Zmanjšana stopnja srbeža je bila posledica delovanja antihistaminka *feksofenadina*. Uporaba vitamina E ni pripomogla k zmanjšanju števila kokov in kvasovk. Prav tako zdravljenje z vitaminom E ni imelo vpliva na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemičnoobarvanega 3-NT. Razlik med spoloma pri zdravljenju z vitaminom E nismo ugotovili. Z raziskavo smo ovrgli hipotezo, da ima zdravljenje AD z vitaminom E vpliv na zmanjševanje vsebnosti imunohistokemičnoobarvanega 3-NT. Hipotezo, da je uporaba vitamina E smiselna pri zdravljenju AD pri psih, smo deloma potrdili, deloma ovrgli, saj ima zdravljenje z vitaminom E vpliv na izboljševanje kliničnih znakov psov z AD, vendar pa ne vpliva na izboljševanje stopnje srbeža in število kokov in kvasovk na koži trebuha in sluhovodov psov.

V nadaljnje raziskave bi bilo primerno vključiti vpliv peroralnega zdravljenja hkrati s topikalnim zdravljenjem z vitaminom E, vpliv letnih časov oz. dejavnikov okolja (kot so temperatura, vlaga, zračnost), pasemskih razlik ter vpliv spolnih hormonov na nastanek in odziv na zdravljenje AD. Topikalno zdravljenje kožnih bolezni z oljem vitamina E je pri

Ijudeh koristno v večini primerov AD. Temperatura, vlaga in zračnost v okolju lahko vplivajo na občutljivost in doveznost kože na alergene iz okolja, ki lahko vodijo v nastanek AD. Različne pasme psov so različno nagnjene k določenim boleznim. Zato bi raznolikost pasem lahko vplivala na različen potek bolezni in odziv na zdravljenje AD. Rezultati vpliva zdravljenja AD z vitaminom E bi bili morda bolj primerljivi, če bi bili v raziskavo vključene zgolj nesterilizirane in nekastrirane živali ali zgolj sterilizirane oziroma kastrirane živali, saj imajo tudi spolni hormoni pomemben vpliv na kožo.

8. ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujeva doc. dr. Tini Kotnik za postavitev trdnih temeljev, na katerih je slonela najina vztrajnost, zagretost in neustavljava volja do dela.

Iz srca se zahvaljujeva prof. dr. Gregorju Majdiču za strokovno pomoč pri prehajanju ovir, zaupanje v najino delo in potrpežljivost pri usmerjanju najine raziskave na pravo pot.

Najlepše za zahvaljujeva zaposlenim na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani za pomoč pri uresničevanju najinega dela.

Predvsem se zahvaljujeva prof. dr. Milki Vrecl za možnost uporabe mikroskopa, podporo in pomoč pri mikroskopiranju, ter Jasni Šporar za hitro odzivnost in pomoč pri pripravi in obdelavi rezin.

Iskrena hvala Katji Kozinc, univ. dipl. bioteh. za njeno nesebično pomoč pri vpeljevanju najinega dela v svet imunohistokemije, delo z miškami in za njeno neomajno dobro voljo, ki nama je pomagala zagledati vrh optimizma.

Najlepša hvala dr. Tomažu Büdefeldu, univ.dipl. mikrobiol. za njegovo vsestransko pomoč v času najinega dela v laboratoriju, prijaznost in pripravljenost za reševanje nerešljivih težav.

Hvala Jasmini Kerčmar, dr. vet. med. za koristne napotke pri razpletanju grafičnih problemov, uporabne nasvete in prijetne pogovore.

Hvala asist. dr. Katerini Čeh, asist. dr. Neži Grgurevič in Tanji Španič, dr. vet. med., za koristne nasvete in prijazno pomoč na vsakem koraku najinega dela.

Hvala Nini Šterman za prijetno preživet čas med delom z miškami in za prijateljstvo, ki ne bo nikdar pozabljeno.

Iskrena hvala Urošu Zarniku, univ. dipl. ekon., za čas in trud, ki ga je vložil v najino uvajanje v svet excela.

Najlepša hvala ljubljenim in domaćim za njihovo brezmejno ljubezen, ki nama je v času študija in raziskovalnega dela dajala moč za hojo po poti proti zmagi in vero v sebe, da je nadin uspeh neizogiben.

9. LITERATURA

1. Abu-Qare AW, Suliman HB, Abou-Donia MB. Induction of urinary excretion of 3-nitrotyrosine, a marker of oxidative stress, following administration of pyridostigmine bromide, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) and permethrin, alone and in combination in rats. *Toxicol Lett* 2001; 121: 127–34.
2. Ahn B, Han BS, Kim DJ, Ohshima H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosinein rat liver tumors induced by N-ityrosodiethylamine. *Carcinogenesis* 1999; 20 (7): 1337–44.
3. Äkerstedt J, Vollset I. Review: *Malassezia pachydermis* with special reference to canine skin disease. *Br Vet J* 1996; 152: 269–81.
4. Antille C, Sorg O, Lübbe J, Saurat JH. Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis. *Dermatology* 2002; 204: 69–71.
5. Azzi A, Ricciarelli R, Zingg JM. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett* 2002; 519: 8–10.
6. Basu AK, Marnett LJ. Unequivocal demonstration that alondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 1983; 4 (3): 331–3.
7. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 797-803.
8. Bond R, Lamport AI, Lloyd DH. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the air and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Res Vet Sci* 2000; 68: 291 – 93.
9. Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17: 663–69.
10. Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-alpha transgenic mouse model of liver cancer. *Journal of Hepatology* 2004; 41: 815–22.
11. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 328-40.
12. Catala A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 318–33.
13. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (10): 123–30

14. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology* 2002; 180: 195–207.
15. Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI. Imunohistochemical study on the distribution of nitrotyrosine and neuronal nitric oxide synthase in aged rat cerebellum. *Brain Res* 2002; 951 : 316–21.
16. Claycombe CJ, Meydani SN. Vitamin E and genome stability. *Mutat Res* 2001; 475: 37–44.
17. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, Duff GW, Ward SJ, Tazi-Ahnini R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118 (1): 3–21.
18. Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur Pharma Biopharm* 2009; 72: 295–303.
19. Daser A, Meissner N, Herz U, Renz H. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 762–70.
20. DeBoer DJ, Marsella E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 239–49.
21. Dell DL, Griffin CE, Thompson LA, Griffies JD. Owner assessment of therapeutic interventions for canine atopic dermatitis: a long-term retrospective analysis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 228–37.
22. Droege W. Free radicals in the control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–9.
23. Duthie GG. Lipid peroxidation. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 759–64.
24. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81–128.
25. Tsoureli-Nikita E, Hercogova J, Lotti T, Menchini G. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. *Int Dermatol* 2002; 41: 146–50.
26. Favrot C. Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis. *Eur Companion Anim Pract* 2009; 19 (3): 219–22.

27. Feingold KR, Denda M. Regulation of permeability barrier homeostasis. *Clin Dermatol* 2012; 30: 263–68.
28. Gallaher DD, Csallany AS, Shoeman DW, Olson JM. Diabetes increases excretion of urinary malondialdehyde conjugates in rats. *Lipids* 1993; 28 (7): 663–6.
29. Germaini PA, Prelaud P, Bensignor E. CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) reproducibility. *Rev Med Vet* 2005; 156 (7): 382–85.
30. Ginel PJ, Lucena R, Rodriguez JC, Ortega J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from external ear canal of dogs and cats. *Vet Dermatol* 2002; 13: 151–6.
31. Girault I, Karu AE, Schaper M, et al. Immunodetection of 3-nitrotyrosine in the liver of zymosan-treated rats with a new monoclonal antibody: Comparison to analysis by HPLC. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (11): 1375–87.
32. Girolomni G, Sebastiani S, Albanesi C, Cavani A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 733–7.
33. Gittler JK, Krueger JG, Guttmann-Yassky E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 131 (2): 300–13.
34. Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestation of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81 (3/4): 255–69.
35. Groen D, Poole DS, Gooris GS, Bouwstra JA. Investigating the barrier function of skin lipid models with varying compositions. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 79: 334–42.
36. Gupta J, Grube E, Erickson MB, et al. Intrinsically defective skin barrier function in children with atopic dermatitis correlates with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121 (3): 725–30.
37. Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 133–40.
38. Guttmann-Yassky E, Nogales KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127: 1420–32.
39. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nut* 1993; 57: 715S-25S.

40. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (10): 5-12.
41. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989; 366-408.
42. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (3): 14–22.
43. Harvey RG, Noble WC. A temporal study comparing the carriage of *Staphylococcus intermedius*, on normal dogs with atopic dogs in clinical remission. *Vet Dermatol* 1994; 5: 21–6.
44. Herold S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radic Biol Med* 2004; 36 (5): 565–79.
45. Hillier A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. *Vet Med* 2002; 97 (3): 198–208.
46. Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 147–51.
47. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975; 14: 5294–9.
48. Horney B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 178–89.
49. Howell MD, Kim BE, Gao P, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filagrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120 (1): 150–5.
50. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 145–69.
51. Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspect Med* 2007; 28 (5/6): 646 –67.
52. Jensen JM, Pfeiffer S, Witt M, et al. Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123 (5): 1124–33.
53. Jung T, Stingl G. Atopic dermatitis: Therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122 (6): 1074–81.

54. Kabashima K. Pathomechanism of atopic dermatitis in the perspective of T cell subsets and skin barrier functions “Which comes first, the chicken or the egg?”, *Dermatol Sin* 2012; 30: 142–6.
55. Kabashima K. New concepts of the pathogenesis of atopic dermatitis: Interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. *J Dermatol Sci* 2013; 70 (1): 3–11.
56. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, et al. Atopic dermatitis and skin disease: Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filagrin-null mice. *J Allergy Cell Immunol* 2012; 129 (6): 1538–46.
57. Kezic S, O'Regan G, Lutter R, et al. Filagrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filagrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129 (4): 1031–9.
58. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related disease and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009; 3: 73–80.
59. Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2012; 38: 96–109.
60. Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J* 2007; 173: 502–11.
61. Kubo M, Kambayashi Y, Takemoto K, Okuda J, Muto M, Ogino K. Reactive nitrogen species formation in eosinophils and imbalance in nitric oxide metabolism are involved in atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Ngamice. *Free Radic Res* 2005; 39 (7): 719–27.
62. Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, et al. Filagrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 866–71.
63. Mason IS, Lloyd DH. The role of allergy in the development of canine pyoderma. *J Small Anim Pract* 1989; 30: 216–8.
64. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83–104.
65. Mates JM, Perez-Gomez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clin Chim Acta* 2000; 296: 1–15.

66. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32 (8): 595–603.
67. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32 (2): 157–70.
68. Matsumoto M, Sugiura H, Uehara M. Skin barrier function in patients with completely healed atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2000; 23: 178–182.
69. May ER, Kinyo JM, Noxon JO. Nasal carriage of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma or both. *Vet Microbiol* 2012; 160: 443–8.
70. Mazor D, Brill G, Shorer Z, Moses S, Meyerstein N. Oxidative damage in red blood cells of vitamin E deficient patients. *Clinica Chimica Acta* 1997; 265: 131–7.
71. McEwan NA. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2000; 68: 279–83.
72. McEwan NA, Kalna G, Mellor D. A comparison of adherence by four strains of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hominis* to canine corneocytes collected from normal dogs and dogs suffering from atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2005; 78: 193–8.
73. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of stratum corneum. *Int J Pharm* 2012; 435: 3–9.
74. Motta S, Letellier C, Ropert M, Motta C, Thiebault JJ. Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity. *Vet J* 2009; 181: 288–95.
75. Mündlein M, Valentin B, Chabivski R, et al. Comparison of transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. *Sens Actuators A Phys* 2008; 142 (1): 67–72.
76. Nachbar F, Korting HC. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med* 1995; 73: 7–17.
77. Nardoni S, Dini M, Taccini F, Mancianti F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol* 2007; 122: 172–7.
78. Nardoni S, Mancianti F, Rum A, Corazza M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 141–5.

79. Nicolaou A. Eicosanoids in skin inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; 88: 131–8.
80. Niwa Y, Sumi H, Kawahira K, Terashima T, Nakamura T, Akamatsu H. Cutaneous biology 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* 2003; 149: 248–54.
81. Nonato LB, Lund CH. Transepidermal water loss in the intensive care nursery: measuring techniques and research recommendations. *Newborn Infant Nurs Rev* 2001; 1 (1): 11–20.
82. Oh SY, Chung J, Kim MK, Kwon SO, Cho BH. Antioxidant nutrient intakes and corresponding biomarkers associated with the risk of atopic dermatitis in young children. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 245–252.
83. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2007; 18 (2): 78–86.
84. Olivry T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 11–16.
85. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson JA, Mueller RS, Nuttal T, Prelaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 233–48.
86. Omata N, Tsukahara H, Ito S, et al. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 2001; 69: 223–8.
87. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filagrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122 (4): 689–693.
88. Packer L, Landvik S. Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570: 1–6.
89. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filagrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441–6.
90. Panin G, Strumia R, Ursini F. Topical α-tocopherol acetate in the bulk phase. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 443–7.
91. Plevnik A, Kobal S, Domanjko-Petrič A, Kotnik T. The efficacy of antihistamine fexofenadine versus methylprednisolone in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Slov Vet Res* 2009; 46 (1): 5–12.

92. Plevnik Kapun A. Vpliv vitamina E na oksidativni stres pri psih z atopičnim dermatitisom: doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta 2012.
93. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed Pharmacol* 2007; 61: 412–22.
94. Poulsen HE. Oxidative DNA modifications: *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57 (Suppl.1): 161–9.
95. Quijano C, Romero N, Radi R. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 728–41.
96. Radabaugh MR, Nemirovskiy OV, Misko TP, Aggarwal P, Mathews WR. Immunoaffinity liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection of nitrotyrosine in biological fluids: development of a clinically translatable biomarker. *Anal Biochem* 2008; 380: 68–76.
97. Roosje P. Canine atopic dermatitis: new concept. *Eur J Companion Anim Pract* 2005; 15 (2): 189–95.
98. Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. *Ocular Surf* 2010; 8 (1): 18–28.
99. Sakurai K, Sugiura H, Matsumoto M, Uehara M. Occurrence of patchy parakeratosis in normal-appearing skin in patients with active atopic dermatitis and in patients with healed atopic dermatitis: a cause of impaired barrier function of the atopic skin. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 37–42.
100. Saridomichelakisa MN, Koutinasa AF, Gioulekasb D, Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 61–73.
101. Sasaki S, Shibata N, Komori T, Iwata M. iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosc Lett* 2000; 291: 44–8.
102. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Muller and Kirk's small animal dermatology: structure and function of the skin. 6. ed. Philadelphia: Saunders 2001: 1–2.
103. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration: functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 357–66.

104. Stepanović S, Dimitrijević V, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabic-Vlahović M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. *Vet Microbiol* 2001; 82: 177–85.
105. Stillwell W, Wassall SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 2003; 126 (1): 1–27.
106. Suarez-Fariñaz M, Tintle SJ, Shemer A, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127 (4): 954–64.
107. Šuput D, Kamarić L. Izvor in reakcije prostih radikalov. In: Ribarič S, ed. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izd. Lj: MF, 2003: 15–24.
108. Tanaka K, Shirai T, Nagata E, Dembo T, Fukuuchi Y. Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. *Neurosc Lett* 1997; 235: 85–8.
109. Tarpatzki N, Papa K, eiczigel J, Vajdovich P, Vörös K. Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Vet Hung* 2006; 54 (3): 353–66.
110. ter Steege J, Buurman W, Arends JW, Forget P. Presence of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, CD68, and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Lab Invest* 1997; 77 (1): 29–36.
111. Thakur ML, Srivastava US. Vitamin-E metabolism and its application. *Nutr Res* 1996; 16 (10): 1767–1809.
112. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4–15.
113. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4 (4): 665–73.
114. Tsuboi H, Kouda K, Takeuchi H, et al. 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1998; 138 (6): 1033–5.
115. Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki, et al. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 2003; 72: 2509–16.
116. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, Jones JCR. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends Cell Biol* 2002; 12 (8): 355–357.
117. Tupker RA. Standardization of transepidermal water loss (TEWL) measurement.

- J Eur Acad Dermatol Venereol 1997; 9 (1): 91.
118. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
119. Vasilaki AT, Leivaditi D, Talwar D, et al. Assessment of vitamin E status in patients with systemic inflammatory response syndrome: Plasma, plasma corrected for lipids or red blood cell measurements? *Clin Chim Acta* 2009; 409: 41–5.
120. von Bubnoff D., Geiger E., Bieber T. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology: Antigen-presenting cells in allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 329–39.
121. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, et al. Loss-of-function variations within the filagrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy and Clin Immunol* 2006; 118: 214–9.
122. Wertz PW. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Adv Drug Dev Rev* 1995; 18: 283–94.
123. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 1996; 34: 159–87.
124. Yu Z, Lin KK, Bhandari A, et al. The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grlh3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4. *Dev Biol* 2006; 299: 122–36.