

Aus der Medizinischen Kleintierklinik  
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ralf Müller

**Wirkung essentieller Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren mononukleären  
Zellen und Expression von Zytokinen bei Hunden mit atopischer Dermatitis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von  
Melanie Stehle  
aus Friedrichshafen am Bodensee

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun  
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Müller  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 08.02.2008

## **Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>I Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>II Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1. Atopische Dermatitis .....	3
2.1.1. Einführung .....	3
2.1.2. Canine atopische Dermatitis .....	5
2.2. Fettsäuren.....	6
2.2.1. Nomenklatur der Fettsäuren.....	6
2.2.2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	7
2.2.3. Biosynthese der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren.....	8
2.2.4. Konversion der Fettsäuren .....	10
2.2.5. Synthese von Eicosanoiden.....	11
2.2.6. Wirkung von Eicosanoiden.....	12
2.2.7. Entwicklung der Omega-6- und Omega-3- Fettsäuren in der Ernährung.....	13
2.2.8. Nahrungsquellen für Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren .....	14
2.2.9. Klinische Bedeutung der Omega-3-/Omega-6-Fettsäuren bei Hunden und Katzen.....	15
2.2.10. Klinische Bedeutung der Omega-3-/Omega-6-Fettsäuren bei Menschen .....	16
2.3. Fettsäuren in der Haut.....	16
2.3.1. Aufbau der Haut.....	16
2.3.2. Essentielle Fettsäuren und Zellmembranen .....	17
2.3.3. Dysfunktion der Hautbarriere .....	18
2.4. Eigenschaften der Fettsäuren .....	18
2.4.1. Allgemeine Eigenschaften .....	19
2.4.2. Eicosanoide .....	19
2.4.3. Immunmodulation.....	22
2.4.4. Essentielle Fettsäuren und das Second-Messenger System.....	23
2.4.5. Wirkung auf die Zellmembran.....	24

---

2.5.	Immunologische Zusammenhänge .....	24
2.5.1.	Immunpathologie .....	24
2.5.2.	Antigen präsentierende Zellen .....	24
2.5.3.	Rolle der Keratinozyten .....	26
2.5.4.	Zytokine .....	26
2.5.5.	IgE und IgE-Rezeptoren .....	27
2.5.6.	Delta -6-Desaturase-Mangel .....	28
2.5.7.	Genetik und Umwelteinflüsse.....	28
2.6.	Zytokine und Atopie .....	29
2.6.1.	Interleukin-4.....	30
2.6.2.	Interferon- $\gamma$ .....	30
2.6.3.	Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....	32
2.6.4.	Nachweis von Zytokinen .....	33
2.7.	Fettsäuren als Therapie .....	33
<b>III</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
	<b>Einschlußkriterien der Hunde.....</b>	<b>35</b>
	<b>Zellkultur-Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1.	Material .....	35
3.2.	Methoden .....	35
3.2.1.	Blutentnahme aus der Vena jugularis .....	35
3.2.1.1.	Vorversuche Blutentnahme.....	36
3.2.1.1.1.	Optimierung der Leukozyten-Gewinnung aus Hundeblood.....	36
3.2.1.1.2.	Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen in Blutproben.....	36
3.2.2.	Isolierung von Peripheren Blutleukozyten (PBLs)/ Peripheren Mononukleären Zellen (PBMCs) .....	37
3.2.3.	Ermittlung der Zellzahl .....	38
3.2.4.	Proliferationsversuch .....	38
3.2.4.1.	Vorversuche Proliferation.....	39
3.2.4.1.1.	Ermittlung einer geeigneten Positivkontrolle .....	39
3.2.4.1.2.	Bestimmung der Fettsäurekonzentration .....	39
3.2.4.1.3.	Bestimmung der Allergenkonzentration.....	39
3.2.4.2.	Durchführung Proliferationsversuch.....	40
3.2.5.	Kultivierung von Zellen für Stimulationsversuch.....	40

---

3.2.5.1.	Vorversuche Stimulation .....	40
3.2.5.1.1.	Bestimmung der erforderlichen Zellkonzentration.....	40
3.2.5.1.2.	Inkubation der PBLs über 6, 10 und 18 Stunden.....	41
3.2.6.	Weiterverarbeitung der PBLs für die RNA-Extraktion .....	41
3.2.7.	Stimulation von peripheren Blutleukozyten .....	41
3.2.8.	Mögliche Weiterverarbeitungstechniken .....	42
3.2.8.1.1.	Trifast <sup>TM</sup> -Methode .....	42
3.2.8.1.2.	Zellen einfrieren.....	42
3.2.8.2.	Zellen auftauen.....	42
3.2.9.	RNA-Präparation .....	43
3.2.9.1.	Durchführung.....	43
3.2.10.	Bioanalyzer .....	44
3.2.10.1.	Durchführung.....	45
3.2.11.	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	46
3.2.12.	QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transkription.....	47
3.2.12.1.	Elimination genomischer DNA.....	47
3.2.12.1.1.	Durchführung.....	47
3.2.12.2.	Reverse Transkription (RT).....	47
3.2.13.	Etablierung der Primer.....	48
3.2.13.1.	Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen .....	49
3.2.13.1.1.	Blast .....	49
3.2.13.1.2.	Primer Express 3.0.....	49
3.2.13.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	50
3.2.13.2.1.	Durchführung.....	50
3.2.13.3.	Agarosegelelektrophorese.....	51
3.2.13.3.1.	Durchführung.....	51
3.2.13.4.	Standardkurven .....	52
3.2.13.5.	Prüfung der Primer mittels Sequenzierung.....	53
3.2.14.	Ermittlung der Effizienzen von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , $\beta$ -Aktin und 18S rRNA.....	54
3.2.15.	Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese .....	57
3.2.16.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	57
3.2.16.1.	Durchführung.....	59
3.2.16.2.	Auswertung.....	60

<b>IV. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
4.1.1. Blutentnahme an der Vena jugularis.....	62
4.1.1.1. Vorversuch Blutentnahme .....	62
4.1.1.1.1. Optimierung der Leukozyten-Gewinnung aus Hundeblood.....	62
4.1.1.1.2. Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen in Blutproben.....	62
4.1.2. Ermittlung der Zellzahl .....	63
4.1.3. Proliferationsversuch .....	64
4.1.3.1. Vorversuche Proliferation.....	64
4.1.3.1.1. Resultate der Vorversuche .....	64
4.1.3.2. Resultate Proliferationsversuch .....	65
4.1.4. Kultivierung von Zellen für Stimulationsversuch.....	69
4.1.4.1. Vorversuche Stimulation .....	69
4.1.4.1.1. Bestimmung der erforderlichen Zellkonzentration.....	69
4.1.4.1.2. Inkubation der PBLs über 6, 10 und 18 Stunden.....	70
4.1.5. Bioanalyser .....	71
4.1.6. Konzentrationsbestimmung von RNA.....	71
4.1.7. QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transkription.....	71
4.1.8. Etablierung der Primer.....	72
4.1.8.1. Prüfung der Primer mittels PCR und Agarosegelelektrophorese .....	72
4.1.9. Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese .....	73
4.1.10. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	74
4.1.10.1. Statistik .....	74
4.1.10.1.1. Dunn's Test.....	74
4.1.10.2. Ermittlung der Effizienzen von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , $\beta$ -Aktin und 18S rRNA.....	74
4.1.10.2.1. Korrelations- und Regressionsanalyse.....	75
4.1.10.3. Primer der quantitativen Polymerase Kettenreaktion .....	76
4.1.11. Allgemeine Erklärung zur Bestimmung einer relativen IL-4-cDNA-Menge..	78
4.1.11.1.1. Berechnung der relativen IL-4-cDNA-Menge relativ zu einer internen Kontrolle.....	79
4.1.11.2. Vergleich der Effizienzen der Zielgene und Referenzreaktionen.....	80

---

4.1.12.	Resultate der Zytokin-Expressionen .....	80
4.1.12.1.	Interferon- $\gamma$ Expression.....	80
4.1.12.2.	Interleukin-4 Expression.....	83
4.1.12.3.	Transforming growth factor- $\beta$ Expression.....	86
4.1.13.	Vergleich der Zytokinexpressionen zwischen gesunden und atopischen Hunden .....	88
<b>V</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Einfluss der Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren Blutleukozyten.....	89
5.2.	Einfluss auf die Immunantwort.....	89
5.3.	Untersuchung von Zytokinen.....	94
5.4.	Einfluss der essentiellen Fettsäuren auf die Zytokin-Expression .....	95
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>100</b>
<b>VII</b>	<b>Summary.....</b>	<b>102</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>IX</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>127</b>
9.1.	Tabellenverzeichnis .....	127
9.2.	Abbildungsverzeichnis.....	128
9.3.	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	131
9.4.	Verbrauchsmaterialien .....	134
9.5.	Geräte in alphabetischer Reihenfolge .....	135
9.6.	Optische Dichte (OD) Messung am Photometer zur Errechnung der einzusetzenden RNA-/RNase freiem Wasser-Menge zur reversen Transkription:.....	137
9.7.	Besitzer-Einverständniserklärung.....	140
9.8.	Besitzerfragebogen .....	141
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>143</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>145</b>



---

**Abkürzungsverzeichnis**

AA	Arachidonsäure (engl. <i>Arachidonic Acid</i> )
Abb	Abbildung
AD	atopische Dermatitis
ALA	Alpha-Linolensäure (engl. <i>Alpha-Linolenic-Acid</i> )
All	Allergen
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl. <i>Antigen Presenting Cell</i> )
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
CAD	canine atopische Dermatitis
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
Con A	Concanavalin A
COX	Cyclooxygenase
Cpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>Counts per minute</i> )
DHA	Docosahexaensäure (engl. <i>Docosahexaenoic Acid</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleid Acid</i> )
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DPA	Docosapentaensäure (engl. <i>Docosapentaenic Acid</i> )
Dr	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EFS	Essentielle Fettsäuren
EPA	Eicosapentaensäure (engl. <i>Eicosapentaenoic Acid</i> )
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i> )
FS	Fettsäuren
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ kg} \times \text{m} : \text{s}^2$
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLA	Gamma-Linolensäure (engl. <i>Gamma Linolenic Acid</i> )

---

IDEC	inflammatorische dendritische epidermale Zelle (engl. <i>Inflammatory Dendritic Epidermal Cell</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgE-AK	Immunglobulin E Antikörper
IL-4	Interleukin 4
KGW	Körpergewicht
LA	Linolsäure (engl. <i>Linoleic Acid</i> )
LOX	Lipooxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
mRNA	messenger RNA
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäure(n) (engl. <i>Monounsaturated Fatty Acid</i> )
n-3-FS	Omega-3-Fettsäuren
n-6-FS	Omega-6-Fettsäuren
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTC	Probe ohne cDNA (engl. <i>No Template Control</i> )
OD	optische Dichte
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PNU	Protein-Stickstoff-Einheiten (engl. <i>Protein Nitrogen Units</i> )

---

PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
RIN	RNA Integritätsnummer (engl. <i>RNA Integrity Number</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Echt Zeit Polymerase Ketten Reaktion (engl. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> )
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzellen 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen 2
T <sub>H</sub> 17	T-Helferzellen 17
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
Template	cDNA-haltige Probe
vgl	vergleiche

## I Einleitung

Die canine atopische Dermatitis ist definiert als eine mit einer genetischen Prädisposition verbundene Hauterkrankung, bei welcher Hunde eine Hypersensibilität gegen bestimmte Antigene entwickeln und bei Kontakt mit diesen Antigenen eine klassische Symptomatik zeigen. Charakteristische Symptome sind Juckreiz an prädisponierten Hautstellen assoziiert mit Entzündung und einer IgE-Antikörperbildung gegen Umweltallergene (Olivry et al., 2001a). Die atopische Dermatitis des Hundes ist eine häufige Erkrankung in der Kleintierpraxis (Lund et al., 1999b, Scott und Paradis, 1990). Immunologische Veränderungen und klinische Symptome ähneln denen der humanen atopischen Dermatitis (Nuttall et al., 2002b, Olivry et al., 2006). Die einzige spezifische Behandlung für die atopische Dermatitis ist eine Allergen-spezifische Immuntherapie, bei der die Allergene mittels Intrakutantest oder Allergen-spezifischem IgE-Serumtest identifiziert und nach Herstellung einer Hyposensibilisierungslösung subkutan injiziert werden können (Mueller, 1996, Mueller et al., 2005b, Willemsen et al., 1984). Die Allergen-spezifische Immuntherapie muss in der Regel über Monate hinweg durchgeführt werden, bevor eine Reduktion der klinischen Symptome festgestellt werden kann. Sie führt nicht bei allen Patienten gleichermaßen zu einem Erfolg (Mueller et al., 2000, Mueller, 1996, Scott, 1993).

Zu den symptomatischen Behandlungsmöglichkeiten der caninen atopischen Dermatitis (CAD) zählen Glukokortikoide (Olivry und Mueller, 2003, Olivry und Sousa, 2001), Antihistaminika (Olivry et al., 2001b, Olivry und Mueller, 2003), Fettsäuren-Supplementierung (Mueller et al., 2004, Olivry et al., 2001b), Zyklosporin (Olivry und Mueller, 2003, Olivry et al., 2002), topische Medikamente (Olivry und Mueller, 2003), IFN- $\gamma$ -Applikation (Hayashiya et al., 2002), Pentoxyfyllin und Misoprostol (Olivry et al., 2003). Da Nebenwirkungen bei der Anwendung von Glukokortikoiden sehr häufig sind, erlangen vergleichsweise nebenwirkungsärmere Behandlungsmöglichkeiten wie Antihistaminika und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zunehmend an Bedeutung. Essentielle Fettsäuren wurden in der Humanmedizin bereits bei atopischer Dermatitis (Biagi et al., 1988, Fiocchi et al., 1994, Henz et al., 1999), allergischem Asthma (Okamoto et al., 2000, Stenius-Aarniala et al., 1989), Psoriasis (Mayser et al., 1998), Arthritis (Calder und Zurier, 2001), autoimmuner Nephritis und Morbus Crohn (Belluzzi et al., 1996) eingesetzt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können die Entzündungsreaktionen bei Menschen, Mäusen und Ratten beeinflussen (Horie et al., 1991, Schafer und Kragballe, 1991, Terencio et al., 1998, Watanabe et al., 1994). Eine orale

Fettsäure-Supplementierung hat einen positiven Einfluss auf die Entzündungsreaktion und auf den Atopie-assoziierten Juckreiz (Scott et al., 1992). In einer doppelt verblindeten, Placebo-kontrollierten und randomisierten Studie konnte bei 10 - 20 % der Hunde durch Fettsäuren-Supplementierung eine vollständige Remission erreicht und bei 40 % eine signifikante Linderung der klinischen Symptome erzielt werden (Mueller et al., 2004). Verbesserungen der Symptomatik konnten durch die alleinige Verabreichung von Omega-6-Fettsäuren ( $\gamma$ -Linolensäure, GLA) (Scarff und Lloyd, 1992), durch Kombination von GLA mit Omega-3-Fettsäuren (Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, EPA und DHA) (Bond und Lloyd, 1992, Scott et al., 1992), variablen Dosen an Omega-3-Fettsäuren (Logas, 1994) oder Omega-3-Fettsäuren enthaltende Diäten (Glos, 2007) erreicht werden. Verantwortlich für die positiven therapeutischen Effekte sind neben der Stabilisierung der epidermalen Barrierefunktion die immunmodulatorischen Eigenschaften der essentiellen Fettsäuren.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der verschiedenen essentiellen Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren Blutleukozyten zu untersuchen. Zusätzlich wurde über quantitative Polymerase Kettenreaktionen der Einfluss von essentiellen Fettsäuren auf die Expression von verschiedenen Zytokinen bestimmt.

## II Literaturübersicht

### 2.1. Atopische Dermatitis

#### 2.1.1. Einführung

Die Verbreitung der humanen atopischen Dermatitis nimmt seit dem zweiten Weltkrieg stetig zu. In Nordeuropa ist laut der 'Global International Study of Asthma and Allergies in Childhood' die Prävalenz am Höchsten (1998). Bis zu 20 % der Kinder entwickeln heutzutage das charakteristische Krankheitsbild der atopischen Dermatitis (1998). Die ersten Symptome werden bei 85 % der Erkrankten in den ersten fünf Lebensjahren ersichtlich (Kay et al., 1994). 20 % der Kinder, bei welchen die Symptome bereits vor einem Alter von zwei Jahren auftreten, haben eine lebenslange Manifestation (Ozkaya, 2005, Williams und Strachan, 1998). Die Hälfte dieser Kinder entwickeln in den darauffolgenden Jahren Asthma (Warner, 2001).

Das zunehmende Auftreten von atopischen Erkrankungen (atopische Dermatitis, Asthma und allergische Rhinitis) in der westlichen Gesellschaft wurde mit einer sinkenden Allergenkonzentration in den Haushalten, schädlichen Schadstoffen, zurückgehenden Familiengrößen, abnehmender mikrobieller Keimbelastung und Infektionen in früher Kindheit sowie veränderten Essgewohnheiten in Zusammenhang gebracht (Boguniewicz und Leung, 1998, Okudaira und Mori, 1998). Zusätzlich scheint die weit verbreitete Anwendung prophylaktischer Parasitenbekämpfung die Häufigkeit der atopischen Dermatitis zu erhöhen (Hagel et al., 1993a, Hagel et al., 1993b). Neben Metabolisierungsdefiziten, auf welche in folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird, erhöht eine genetische Veränderung ebenfalls die Häufigkeit der AD (Boguniewicz und Leung, 1998).

Juckreiz bei Hunden in Verbindung mit hypersensitiven Reaktionen ist der häufigste Grund, weshalb Hunde in einer dermatologischen Praxis vorgestellt werden (Lund et al., 1999b, Scott und Paradis, 1990). Angaben über die Prävalenz der atopischen Dermatitis in der Tiermedizin schwanken in der Literatur zwischen 3 und 15 % (Chamberlain, 1974, Reedy, 1997, Scott, 2001). Vor mehr als 60 Jahren wurde erstmalig von einem Hund mit saisonaler, allergischer Rhinitis berichtet (Wittich, 1941). 1971 wurden von Halliwell und Schwartzman die klinischen Symptome der caninen atopischen Dermatitis beschrieben (Halliwell, 1971). In selteneren Fällen tritt neben Juckreiz auch Konjunktivitis, Rhinitis und Asthma auf (Griffin, 1991). Bei 21,6 % der mit „Haut- oder Ohrenerkrankungen“ vorgestellten Hunde lag eine

canine atopische Dermatitis vor (Lund et al., 1999a). 27 % der Hunde mit juckenden Hauterkrankungen, welche einem Intrakutantest unterzogen wurden, litten an CAD (DeBoer, 1989). Die Pathophysiologie der AD beinhaltet eine komplexe Verknüpfung zwischen genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen, infektiösen Agentien, Defekten in der epidermalen Barriere und der Immunantwort (Novak et al., 2003a).

Großes Interesse gilt der Rolle der  $T_H1$ - und  $T_H2$  Zytokine in der atopischen Dermatitis (Leung, 2000). Die  $T_H2$  Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 unterstützen die humorale Immunität und IgE Produktion, welche charakteristisch für die AD sind.  $T_H1$  Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  unterstützen die zellmedierte Immunität (Abbas et al., 1996, Romagnani et al., 1997). In verschiedenen humanmedizinischen Studien (Koning et al., 1997a, Koning et al., 1997b, Neumann et al., 1996, van der Heijden et al., 1991, van Reijssen et al., 1992) und in Mausmodellen (Spergel et al., 1999, Vestergaard et al., 1999) wurden  $T_H2$  Polarisationen bei Atopie festgestellt. Die Anwesenheit von  $T_H1$  Zytokinen in chronischen Läsionen (Werfel et al., 1996) und in Patchtests (Thepen et al., 1996) bestätigen den Zusammenhang mit der AD. Ferner wurde nachgewiesen, dass eine Toleranz von der Anwesenheit immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  beeinflusst wurde. Diese Beeinflussung war stärker als der Einfluss einer  $T_H1$  Polarisation (Koulis und Robinson, 2000).

### **2.1.2. Canine atopische Dermatitis**

Die drei häufigsten Allergien beim Hund sind die Flohspeichelallergie, Futtermittelallergie und canine atopische Dermatitis. Die canine atopische Dermatitis ist nach der Flohspeichelallergie die zweithäufigste allergische Erkrankung (Vollset, 1985). Eine atopische Dermatitis kann auch zusammen mit einer Futtermittelallergie auftreten (Rosser, 1993, White, 1986). Die typischen Lokalisationen der CAD beim Hund sind das Gesicht, die Ohren, die Pfoten, die Extremitäten und das Abdomen. Es können nur einzelne oder auch mehrere Regionen betroffen sein. Über generalisierten Juckreiz wird bei 40 % der Hunde berichtet (Nesbitt, 1984, Scott, 1981). Das Vorhandensein von Primärläsionen variiert in der Literatur, manche Hunde entwickeln keine Primärläsionen (Halliwell, 1971, Scott, 1981). Wenn eine Primärläsionen auftritt, handelt es sich in der Regel um ein Hauterythem (Chamberlain, 1974). Sekundärläsionen werden bei CAD häufig gesehen. Diese spiegeln den chronischen Juckreiz und das damit verbundene Trauma, die chronische Entzündung und Sekundärinfektionen wieder. Zu den Sekundärläsionen zählen Hyperpigmentierung, Schuppen, rot-braune Speichelverfärbungen, selbstinduzierte Alopezie, Exkorationen, stumpfes Fell und Lichenifikationen (Halliwell, 1971, Scott, 1981). Sekundäre Pyodermien können bei 68 % der Hunde beobachtet werden (Griffin, 1993). Bakterielle Pododermatitiden und eitrige Knötchen wurden ebenfalls als Manifestationen beschrieben (Reedy, 1997, Scott, 2001). Otitis externa und Juckreiz im Bereich der Ohren wurden in einer unveröffentlichten Studie bei 86 % der Hunde beschrieben (Muse, 1996). Bei 50 % der Hunde ist eine Konjunktivitis vorhanden (Scott, 1981).

Allergene können über die Haut und den Respirationstrakt in den Körper der Hunde gelangen. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Allergene mit der Atemluft aufgenommen werden, diese den Respirationstrakt penetrieren und über den Blutkreislauf zur Haut gelangen. Sie binden an IgE Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen und regen die Zellen zur Degranulierung an (Olivry et al., 2001a, Olivry und Hill, 2001). Mehreren Studien zufolge ist jedoch der epidermale Weg der Allergenpenetration wahrscheinlicher. Es wird davon ausgegangen, dass Umweltallergene direkt durch das Stratum corneum der Haut eindringen, Kontakt zu den Antigen präsentierenden Zellen der Epidermis aufnehmen und eine Entzündung der Haut verursachen. Diese Hypothese beruht auf klinischen und histologischen Befunden. Besonders haarlose oder wenig behaarte Körperbereiche sind betroffen. Diese Bereiche sind vermehrter Reibung ausgesetzt, wodurch ein Eindringen der Allergene



erleichtert wird (Marsella et al., 2005). Die Antigen präsentierenden Langerhanszellen werden in Hautbereichen mit klinischen Veränderungen in höherer Anzahl gesehen als in der unveränderten Haut gesunder Hunde (Day, 1996, Olivry et al., 1996). Außerdem wird in den veränderten Bereichen der Haut atopischer Hunde IgE auf der Oberfläche von epidermalen Langerhanszellen mit dem hochaffinen FcεRI gebunden (Olivry et al., 1996). Zusätzlich zu den genannten Befunden spricht eine Hyperplasie der T-Lymphozyten in der Epidermis der betroffenen Areale für eine Stimulation durch Antigene. Intakte und degranulierte eosinophile Granulozyten unterhalb des Stratum corneum geben ebenfalls einen Hinweis auf den direkten Weg der Allergene durch die Haut (Olivry und Hill, 2001).

## **2.2. Fettsäuren**

### **2.2.1. Nomenklatur der Fettsäuren**

Fettsäuren (FS) sind ein Teil der Lipide und werden auch als aliphatische Karbonsäuren bezeichnet. Es werden

kurzkettige FS:        1 - 7 Kohlenstoffatome  
mittelkettige FS:    8 - 12 Kohlenstoffatome  
langkettige FS:      > 12 Kohlenstoffatome

unterschieden.

Die meisten der etwa 50 natürlichen Fettsäuren haben eine Kettenlänge von acht bis 22 Kohlenstoffatomen. Je nach Grad ihrer Wasserstoffsättigung spricht man von gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA).

### 2.2.2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Es gibt vier Hauptfamilien mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Dazu gehören die Omega-3-, Omega-6-, Omega-7- und Omega-9-Fettsäuren. Diese werden auch als n-3-, n-6-, n-7- und n-9-Fettsäuren bezeichnet. In Tabelle 2-1 ist eine Übersicht der in dieser Studie bedeutenden Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren dargestellt.

**Tab. 2-1: Übersicht bedeutender Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren**

#### Omega-3-Fettsäuren

Bezeichnung	Strukturformel	Kohlenstoffatome	Doppelbindungen	Abkürzung
$\alpha$ -Linolensäure	18:3 n3	<b>18</b>	<b>3</b>	ALA
Eicosapentaensäure	20:5 n3	<b>20</b>	<b>5</b>	EPA
Docosahexaensäure	22:6 n3	<b>22</b>	<b>6</b>	DHA

#### Omega-6-Fettsäuren

Bezeichnung	Strukturformel	Kohlenstoffatome	Doppelbindungen	Abkürzung
Linolsäure	18:2 n6	18	2	LA
$\gamma$ -Linolensäure	18:3 n6	18	3	GLA
Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure	20:3 n6	20	3	DHGLA
Arachidonsäure	20:4 n6	20	4	AA

In der Konfiguration 18:2n-6 (Linolsäure) bezieht sich die Ziffer vor dem Doppelpunkt auf die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül, die Ziffer nach dem Doppelpunkt bezieht sich auf die Anzahl der Doppelbindungen. Die Angabe n-6 gibt Auskunft über die nächstliegende Doppelbindung zum n (methyl)terminalen Ende.

### **2.2.3. Biosynthese der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren**

In tierischen Zellen können nur einfach ungesättigte Fettsäuren synthetisiert werden, während die mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren essentiell sind und über die Nahrung zugeführt werden müssen.

Säugetiere können eine Delta-9-Doppelbindung in gesättigte Fettsäuren einbauen. Dies führt zur Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure oder Palmitoleinsäure. Der Einbau weiterer Doppelbindungen zwischen C-10 und dem Methylende ist beim Säugetier nicht möglich. Linolsäure und Linolensäure sind nicht ineinander umwandelbar, d.h. Omega-3-Fettsäuren können nicht in Omega-6-Fettsäuren umgewandelt werden. Pflanzen können diesen Reaktionsschritt durchführen, da sie die Delta-15-Desaturase besitzen (Calder, 2001b). Neben der Delta-15-Desaturase besitzen Pflanzen Delta-6, Delta-9, Delta-12-Desaturasen (Calder, 2001a), mit denen sie Doppelbindungen einbauen und so aus Ölsäure Linolsäure katalysieren können. Pflanzen können über diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren ihre Kälteempfindlichkeit vermindern (Ishizaki-Nishizawa et al., 1996). In Algen und Phytoplankton hat man eine erhöhte Menge an Omega-3-Fettsäuren festgestellt. Über die Nahrungskette gelangen die Fettsäuren in die Fische und dienen dort ebenfalls als Kälteschutz, indem die Fettsäuren durch Einbau in die Zellmembranen deren Fluidität erhöhen (Metz, 2000).

Tiere und Menschen können im endoplasmatischen Retikulum und in den Peroxisomen aus Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure die entsprechenden Derivate der Omega-3- bzw. Omega-6-Fettsäuren bilden (Mimouni et al., 1991). Im Vergleich zum Menschen ist die Syntheseleistung des Tieres jedoch deutlich höher.

Omega-3-Fettsäuren und Omega-6-Fettsäuren gehören zu den wichtigen essentiellen Fettsäuren. Omega-6-Fettsäuren haben im Organismus eine höhere Aktivität als Omega-3-Fettsäuren. Es wird debattiert, ob Omega-3-Fettsäuren generell essentiell sind (Rivers und Frankel, 1981). Wenn man die normale Physiologie des Menschen betrachtet, sind einige Gründe erkennbar, weshalb Omega-6-Fettsäuren im Vergleich zu Omega-3-Fettsäuren die bedeutendere Gruppe der essentiellen Fettsäuren zu sein scheinen:

1. Es gibt kein etabliertes Syndrom bei Omega-3-Fettsäuren-Mangel
2. Ein etablierter essentieller Fettsäuren-Mangel kann nicht durch Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung alleine ausgeglichen werden
3. Alle Gewebe mit Ausnahme der Retina und des Gehirns enthalten mehr Omega-6-Fettsäuren als Omega-3-Fettsäuren.

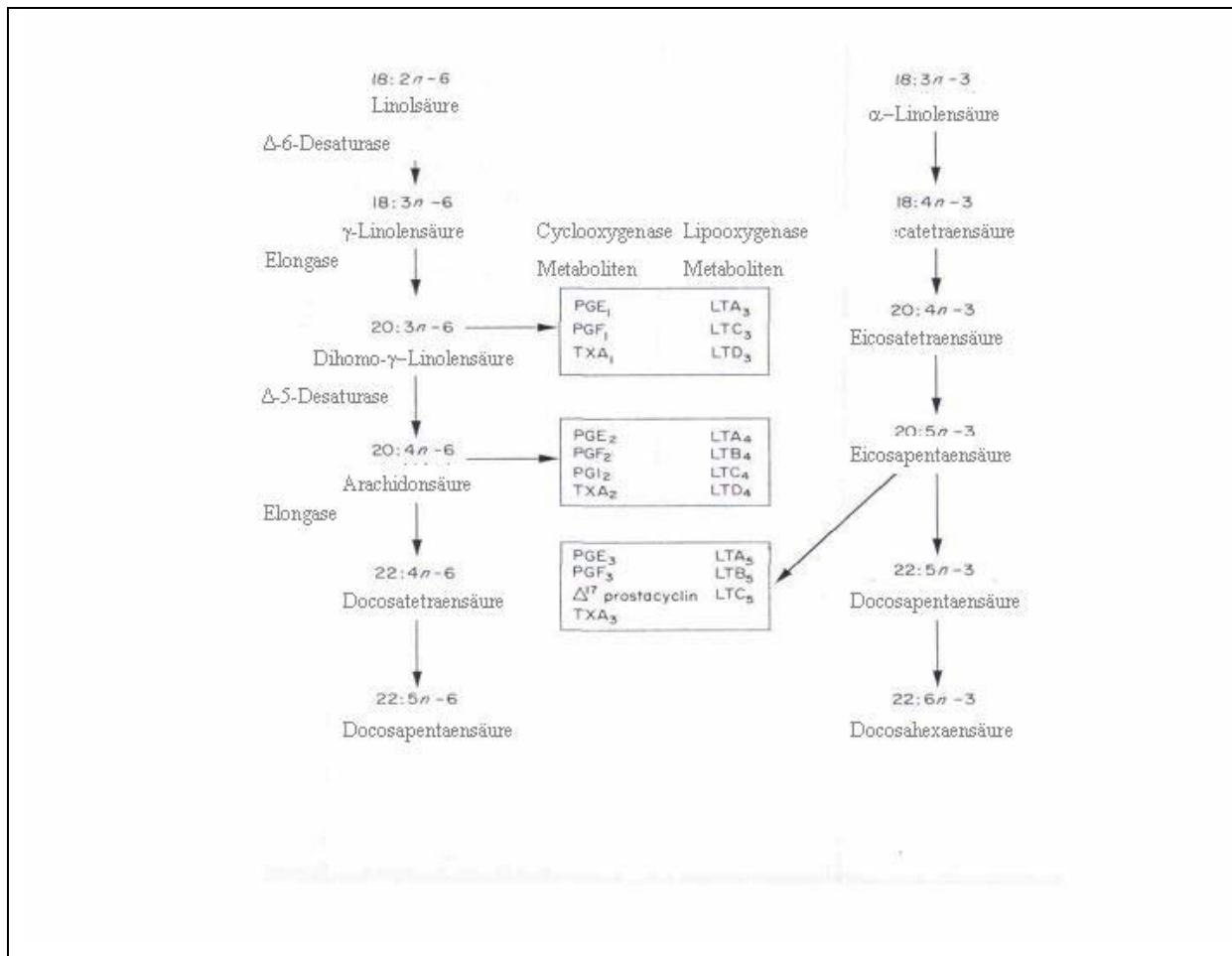
Omega-6-Fettsäuren werden hauptsächlich in Form von Linolsäure aufgenommen, welche zuerst in ihre langkettigen, mehrfach ungesättigten Metaboliten konvertiert werden müssen, um anschließend ihre biologische Funktion als essentielle Fettsäuren entfalten zu können (Crawford, 1983). Der erste Schritt hierzu ist die Konversion zu GLA, welcher durch die Menge an Fettsäuren limitiert ist (Brenner, 1981). Nach der Konversion zu GLA kann die Fettsäure Einfluss auf eine Vielzahl nutritiv bedingter Stoffwechselfvorgänge und hormoneller Veränderungen nehmen (Horrobin, 1989, Sprecher, 1981).

#### 2.2.4. Konversion der Fettsäuren

Während der Konversion der Linolsäure in langkettige Metaboliten werden zunehmend Doppelbindungen und Elongationen durchgeführt. Fettsäuren in *trans*-Konfiguration gleichen stereotypisch gesättigten Fettsäuren und haben ähnliche biologische Effekte wie gesättigte Fettsäuren: *Trans*-Fettsäuren inhibieren den Metabolismus der Linolsäure (Kinsella et al., 1981).

In der Omega-3-Familie wird aus der  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3n-3) als Vorstufe über Zwischenschritte Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n-3), Docosapentaensäure (DPA, 22:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) gebildet. In der Omega-6-Familie gilt die Linolsäure (LA, 18:2n-6) als Ausgangspunkt für andere Omega-6-Fettsäuren und über Zwischenschritte wird die Arachidonsäure (AA, 20:4n-6) metabolisiert (Taugbol et al., 1998). In Abb.2-1 wird die Synthese der PUFA durch Desaturierung und Elongation gezeigt. Beide Omega-Fettsäurefamilien konkurrieren um dasselbe Enzymsystem, wobei bei erhöhter Linolsäureaufnahme die Delta-6-Desaturierung in Richtung Arachidonsäure beziehungsweise bei vermehrter Aufnahme von  $\alpha$ -Linolensäure in Richtung Eicosapentaensäure forciert wird.

Die Omega-3-Fettsäure  $\alpha$ -Linolensäure hat die höchste Affinität zum Enzym Delta-6-Desaturase, d.h. sie hemmt kompetitiv die Desaturierung von Linolsäure zu Arachidonsäure. Je nach Konzentrationsverhältnis der Fettsäuren kommt es zu einer Konkurrenzsituation um das Enzym. Ist  $\alpha$ -Linolensäure in hoher Konzentration vorhanden, wird die Katalyse von Linolsäure zu anderen langkettigen Omega-6-Fettsäuren wie der Arachidonsäure unterdrückt. Ist allerdings die Linolsäure im Überschuss vorhanden, wird die Bildung von EPA und DHA aus  $\alpha$ -Linolensäure vermindert. Nicht nur die Kettenverlängerung von EPA zu DHA ist möglich, sondern auch der umgekehrte Weg der Kettenverkürzung durch Verringerung einer Doppelbindung von DHA zu EPA (Barclay et al., 1998).



**Abb. 2-1: Konversion der Omega-3/Omega-6-Fettsäuren in verschiedene Fettsäuren und entsprechende Eicosanoide. Eicosanoide werden aus den biologischen Vorstufen Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Dihomo-γ-Linolensäure synthetisiert.**

### 2.2.5. Synthese von Eicosanoiden

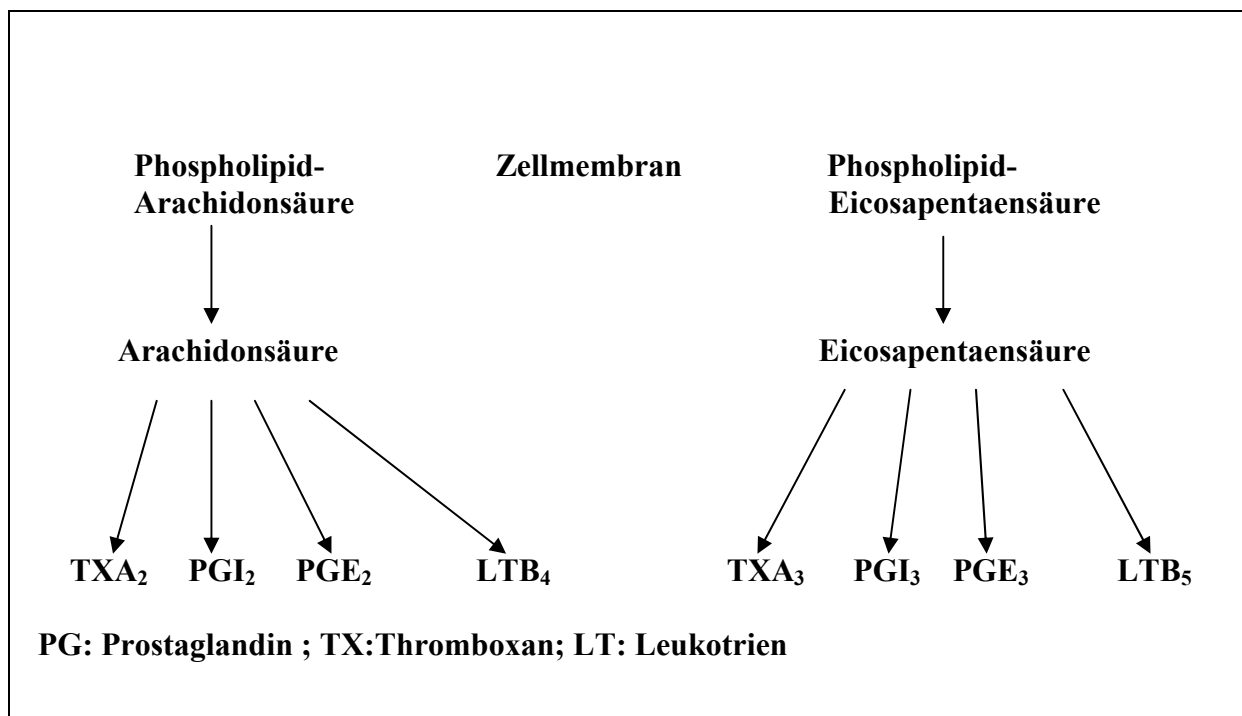
Tritt im Körper eine Entzündung auf, wird in der Zellmembran Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert. Sie setzt aus den Phospholipiden der Zellmembranen C-20-Fettsäuren frei. Diese werden zu Eicosanoiden synthetisiert. Abhängig von der Art der freigesetzten Fettsäure werden verschiedene Arten von Eicosanoiden gebildet (Abb.2-1).

Wichtige Bausteine in der Synthese der Eicosanoide sind die Arachidonsäure (AA) und Dihomo-γ-Linolensäure aus der Omega-6-Fettsäuren-Familie und die Eicosapentaensäure (EPA) aus der Omega-3-Fettsäuren-Familie.

Sowohl die AA als auch die EPA sind Ansatzpunkte für die Cyclooxygenase (COX) und 5-Lipoxygenase (LOX). Je nach Ausgangssubstanz werden spezifische Eicosanoide synthetisiert (Maynar et al., 2001)

### 2.2.6. Wirkung von Eicosanoiden

Aus der Arachidonsäure werden Prostaglandine der Zweierreihe, Thromboxan A<sub>2</sub> und Leukotriene der Viererreihe gebildet. Sie wirken proinflammatorisch, vasokonstriktorisch, immunsuppressiv und fördern die Aggregation der Blutplättchen. Aus der Eicosapentaensäure werden Prostaglandine der Dreierreihe, Thromboxan A<sub>3</sub> und Leukotriene der Fünferreihe metabolisiert. Sie wirken antiinflammatorisch, vasodilatatorisch, nicht immunsuppressiv und haben nur eine geringe Wirkung auf die Thrombozytenaggregation. Die Metaboliten der beiden Omega-Familien unterscheiden sich darin, dass die Produkte aus der EPA jeweils eine Doppelbindung mehr zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom, vom Methylende aus gesehen, enthalten.



**Abb. 2-2: Eicosanoidsynthese aus der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure**

Durch vermehrten Einbau von EPA oder DHA in die Phospholipide der Zellmembranen wird die AA in den Phospholipiden verdrängt, wodurch die Ausgangssubstanz für Eicosanoide der Zweierreihe vermindert wird. EPA und DHA hemmen kompetitiv den Abbau durch die Cyclooxygenase. Der Abbau durch die Lipooxygenase wird zwar nicht gehemmt, jedoch konkurrieren sie um dieses Enzym (Metz, 2000). Die Menge an Leukotrien B<sub>4</sub> wird verringert, die an Leukotrien B<sub>5</sub> dagegen erhöht. In Folge dessen wird die Entzündungsreaktion gehemmt (Vaughn, 1994).

### **2.2.7. Entwicklung der Omega-6- und Omega-3- Fettsäuren in der Ernährung**

Die Ernährung unserer Urahnen als Sammler und Jäger war reicher an Ballaststoffen, Proteinen und Pflanzeninhaltsstoffen als unsere Ernährung heutzutage. Im Gegensatz dazu war sie weniger reichhaltig an Zucker und Fett. In unserer heutigen Ernährung wird doppelt so viel Fett wie im Paläolithikum aufgenommen (Eaton und Konner, 1985). Zusätzlich hat sich das Omega-6/Omega-3-Fettsäuren-Verhältnis geändert. Der Gehalt an Omega-3-Fettsäuren ist nun niedriger, das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren stieg über die Jahrtausende an und liegt heutzutage bei 25:1, während es im Paläolithikum bei 2:1 lag (Eaton und Konner, 1985, Simopoulos, 1991, Simopoulos, 1998, Simopoulos, 1999, Simopoulos, 2000). Gründe hierfür sind die veränderten Bezugsquellen für Nahrung. Unsere Vorfahren aßen als Fleischquelle Wild mit einem Fettanteil von ca. 5 %. Bei unseren heutigen Schlachttieren liegt der Fettanteil bei ca. 30 %. Wildtiere ernähren sich im Vergleich zu den heutigen Schlachttieren von Moosen und Farnen, welche reich an Omega-3-Fettsäuren (EPA) sind. Das Fleisch unserer Haustiere enthält keine Omega-3-Fettsäuren, jedoch einen hohen Anteil an Arachidonsäure (Metz, 2000).

Durch die Entwicklung des Ackerbaus wurde Getreide in den Speiseplan aufgenommen. Mais, Weizen und Reis ersetzen die Wildpflanzen in der Ernährung. Dies führte dazu, dass sich das Verhältnis Omega-6:Omega-3-Fettsäuren ebenfalls erhöhte. Eine ähnliche Tendenz des Omega-6:Omega-3-FS-Verhältnisses sieht man bei Lachs bzw. anderen Fischarten aus Zuchtbetrieben, die im Vergleich zu ihren wildlebenden Artgenossen ebenfalls weniger Omega-3-Fettsäuren enthalten (van Vliet und Katan, 1990). Studien zeigen, dass auf Grund einer sehr fischreichen Ernährung die Fettsäureverhältnisse beim Menschen unterschiedlich sind. Eskimos, die fast ausschließlich von Fisch leben, haben ein Verhältnis von Omega-6:Omega-3-Fettsäuren von ca. 1:3 (Bang und Dyerberg, 1972, Bang et al., 1976). Eskimos haben, wenn sie in ihrer natürlichen Umgebung leben, eine niedrigere Inzidenz an Hautveränderungen zu erkranken als zum Beispiel Menschen in Zentraleuropa oder den Vereinigten Staaten (Kromann und Green, 1980). Bang *et al.* (1976) beobachteten in den 70er Jahren, dass Eskimos ebenfalls seltener an koronaren Herzerkrankungen und Krebs litten als die Bevölkerung in den westlichen Industrieländern. Auch bei Japanern, die eine sehr fischreiche Nahrung zu sich nehmen, stellte man ein günstiges Omega-6:Omega-3-Fettsäurenverhältnis von 3:1 fest.

In der westlichen Welt kehrte sich dieses Verhältnis um. In einer Studie von Kelly *et al.* (1991) wurden Omega-6:Omega-3-Fettsäurenverhältnisse zwischen 15:1 und 50:1 in der



Nahrung ermittelt (Kelly, 1991), wobei der Durchschnitt laut einer amerikanischen Untersuchung von 1987 bei 25:1 lag (Simopoulos et al., 1991).

### **2.2.8. Nahrungsquellen für Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren**

Omega-6-Fettsäuren kommen hauptsächlich in tierischen Fetten vor. Die Linolsäure findet man zusätzlich in Getreidesamen und Pflanzenölen von Sonnenblumen, Mais und Soja. Reich an  $\gamma$ -Linolensäure sind die Samen von Borretsch, Nachtkerze und schwarzer Johannisbeere. Langkettige Omega-3-Fettsäuren können vermehrt in Lammfleisch, Meeresfischen und Leinsamen nachgewiesen werden. Ebenfalls erhöhte Omega-3-Konzentrationen sind in Algen, Phytoplankton, Seevögeln, Robben und Walen messbar.

Besonders reich an ungesättigten Fettsäuren sind die Fischöle mit bis zu 75 %. EPA und DHA als wichtigste Vertreter der Omega-3-Familie kommen vermehrt in Ölen von Meeresfischen wie Sardinen, Heringen, Makrelen und Lachsen vor. Da sich Meeresfische hauptsächlich von Phytoplankton ernähren, ist der erhöhte Gehalt an DHA und EPA im Vergleich zum mageren Süßwasserfisch erklärbar (Sassen et al., 1994, Zollner und Tato, 1992).

### **2.2.9. Klinische Bedeutung der Omega-3-/Omega-6-Fettsäuren bei Hunden und Katzen**

Bei Hunden werden Omega-3-Fettsäuren therapeutisch bei allergischen Hauterkrankungen (Bond und Lloyd, 1994), Nierenerkrankungen (Brown et al., 2000), Tumoren (Ogilvie et al., 2000) und chronischen Entzündungen (Hall et al., 1999) eingesetzt. Bei Katzen mit miliärer Dermatitis beschreiben Lechowski *et al.* (1998) eine Verbesserung der klinischen Symptomatik bei Gabe von Omega-3-Fettsäuren (Lechowski et al., 1998). Wilhelm (2000) untersuchte bei Katzen den Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl auf den Knochen- und Lipidstoffwechsel (Wilhelm, 2000). In der Diätetik dienen sie zur Unterstützung bei tumorbedingter Kachexie und Niereninsuffizienz. Ein Futtermittelhersteller empfiehlt das Omega-6/Omega-3-Fettsäurenverhältnis von 5:1 bei Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz einzusetzen. Dies reduziert deutlich die Prostaglandin E<sub>2</sub>- und Thromboxan A<sub>2</sub>-Ausscheidung im Harn und vermindert somit entzündliche Prozesse in den Nieren (Bauer et al., 1999). Gleichzeitig wird der glomeruläre Kapillardruck gesenkt und eine Schädigung der Niere durch renale Hypertonie vermieden. Durch eine Ernährung mit optimiertem Omega-Fettsäuren-Verhältnisses kann eine Verschiebung von den entzündungsfördernden zu den entzündungshemmenden Mediatoren bewirkt werden. Mooney *et al.* (1998) beschreiben durch Erhöhung der Omega-3-Fettsäuren ebenfalls eine Abnahme der proinflammatorischen Mediatoren sowie der neutrophilen Granulozyten in der Haut. Dadurch wird die Wundheilung verbessert (Mooney et al., 1998). Mehrfach ungesättigte Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren werden zur Therapie bei Hunden und Katzen mit Entzündungen und immunmedierten Erkrankungen eingesetzt. Wander *et al.* (1997) beobachteten bei Hauttests eine verringerte T-Zell-Immunantwort durch Verringerung des Verhältnisses der Omega-6:Omega-3-Fettsäuren (Wander et al., 1997). 1989 konnten Chang *et al.* bei Ratten durch vierwöchige Gabe von EPA in einer Dosierung von 100 mg/kg/Tag Leukotrien B<sub>4</sub> senken und eine hemmende Wirkung auf natürliche Killerzellen feststellen, welche bei autoimmunen Erkrankungen zellzerstörend wirken (Chang et al., 1989).

### **2.2.10. Klinische Bedeutung der Omega-3-/Omega-6-Fettsäuren bei Menschen**

Beim Menschen werden essentielle Fettsäuren zur Therapie von atopischer Dermatitis (Biagi et al., 1988, Fiocchi et al., 1994, Henz et al., 1999), allergischem Asthma (Okamoto et al., 2000, Stenius-Aarniala et al., 1989), Psoriasis (Mayser et al., 1998), Arthritis (Calder, 2001b), autoimmuner Nephritis und ulzerativer Kolitis (Belluzzi et al., 1996) eingesetzt.

## **2.3. Fettsäuren in der Haut**

### **2.3.1. Aufbau der Haut**

Der Aufbau der Haut lässt sich über ein „Zwei-Abteilungs-Modell“ erklären. Zellen des Stratum corneum sind in lipidreiche interzelluläre Lamellen eingebettet. Die Permeabilität einer Membran ist an die Anwesenheit von lamellären Granula gebunden. Lamelläre Granula wurden bisher nur in keratinisierenden und nicht in nicht-keratinisierenden Epithelien gefunden (Wertz et al., 1986). Bei Tieren mit Fettsäure-Mangel sind die Lamellen nicht mehr vollständig funktionsfähig (Landmann, 1988).

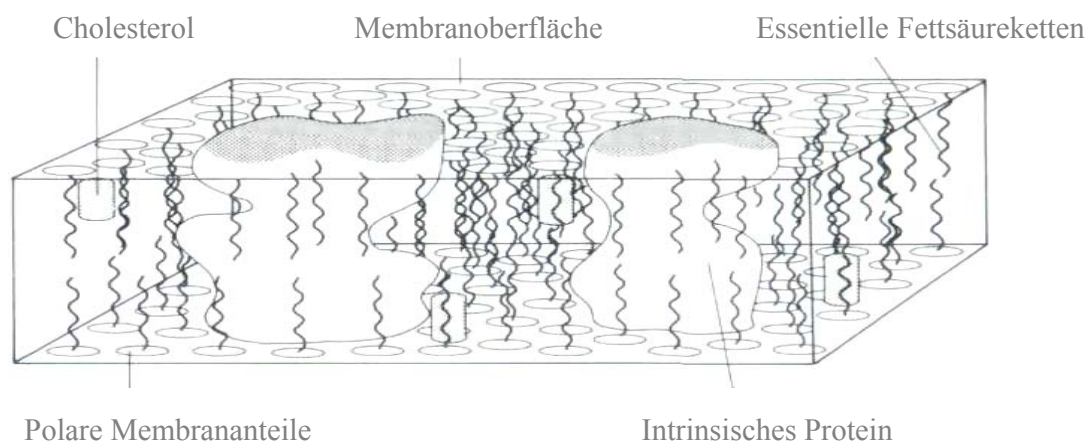
Ceramide sind die größten polaren Lipide im Stratum corneum (Yardley und Summerly, 1981) und ihre Struktur ist nicht in allen Details bekannt (Bowser et al., 1985, Wertz und Downing, 1983). Alle Ceramide enthalten Sphingosine, sowie Phytosphingosine und eine Hydroxy- oder Nicht-Hydroxy gesättigte Fettsäure am Amid-Ende. Zusätzlich haben manche Ceramide an der Esterbindung eine ungesättigte Fettsäure angegliedert. Analysen der Fettsäurezusammensetzung der Haut ergaben, dass die Linolsäure mit 55 % den Hauptanteil der ungesättigten Fettsäuren im Stratum corneum der Säugetiere einnimmt (Abraham et al., 1985).

In initialen Studien wurde vermutet, dass die Linolsäure an Glukose gekoppelt als glykosiliertes Ceramid bindet (Acylglucosylceramid). Diese Moleküle wurden als 1-(3'-*o*-linoleyl)- $\beta$ -D-glucosyl-N-dihydroxypentaltriacontadienoyl-sphingosine bezeichnet (Gray et al., 1978). Einige Zeit später wurde herausgefunden, dass Linolsäure nicht an Glukose, sondern an Kohlenstoffatomen angegliedert ist (Abraham et al., 1985, Wertz und Downing, 1983).

In anderen Studien wurden auch Acylglucosylceramide nachgewiesen (Hou et al., 1991, Wertz und Downing, 1982). Bei einem Mangel an essentiellen Fettsäuren wird das der Linolsäure am ähnlichsten aussehende Analogon (18:1n-9) in die Membran eingebaut. Dieses Molekül ist nicht in der Lage, physiologische lamelläre Granula zu bilden und eine funktionie-

rende Wasserbarriere aufzubauen (Elias und Brown, 1978). Durch die Veränderung der lamellären Zellen werden die lamellären Granula in tiefere Schichten des Stratum corneum verlagert. O-Acylglycosylceramide werden deglycosyliert, so dass o-Acylceramide den Hauptanteil im `toten` Bereich des Stratum corneum einnehmen.

Zellmembranen allgemein bestehen aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden, ebenso Membranen der Mitochondrien und anderer Organellen. Neben den Phospholipiden sind Cholesterol und Proteine eingebaut und wie ein Sandwich angeordnet (Spector und Yorek, 1985). Die polaren Anteile der verschiedenen Glykophospholipidklassen, Choline, Ethanolamine, Serine und Inositole sind an den Oberflächen lokalisiert.



**Abb. 2-3: Aufbau der Haut. An Membranoberflächen sind polare Anteile der Inositole, Serine, Ethanolamine, Choline und Glykophospholipide lokalisiert. Fettsäuren, Proteine und Cholesterol bilden das Gerüst zwischen den Membranoberflächen (modifiziert nach Wright, 1991)**

### **2.3.2. Essentielle Fettsäuren und Zellmembranen**

Durch eine diätetische Zufuhr von essentiellen Fettsäuren werden die Membranfluidität (Stubbs und Smith, 1984) und die dadurch assoziierten physiologischen Prozesse wie z.B. Rezeptorfunktionen (Xu et al., 1988) und Enzymaktivitäten (Engelhard et al., 1976, Tesoriere et al., 1988) verändert.

### **2.3.3. Dysfunktion der Hautbarriere**

Die atopische Dermatitis ist charakterisiert durch eine trockene, nicht zwingend mit Läsionen versehene Haut und einem gesteigerten transdermalen Wasserverlust. Ceramide stellen aufgrund der Bindung mit Proteinen den hauptsächlichen Wasserspeicher im extrazellulären Raum dar (Arikawa et al., 2002, Sator et al., 2003). Im Stratum corneum kommt es zur Veränderung des pH-Wertes und dadurch zur Beeinflussung des Lipidmechanismus der Haut (Rippke et al., 2004). Eine überschießende Chymotrypsin-Enzymmenge im Stratum corneum ist für die Degeneration der epidermalen Barrierefunktion mitverantwortlich (Vasilopoulos et al., 2004). Dies erlaubt die Penetration von irritierenden Substanzen und Allergenen, welche eine Entzündungsreaktion und eine kutane hyperreaktive Reaktion auslösen. Versuche zeigten, dass Hunde mit atopischer Dermatitis abnormale epidermale Lipide integrieren. Die epidermale Lipidbarriere besteht primär aus Sphingolipidceramiden, dazu gehört auch das linolensäurehaltige Ceramid-1. Eine Supplementierung von Linolsäure hat das Potential zur Modulation der klinischen Symptome. Durch die Supplementierung von LA-angereicherten Diäten konnte eine signifikante Abnahme des transdermalen Wasserverlustes gesehen werden.

Daraus resultiert, dass auch bei Hunden oral zugeführte Omega-6-Fettsäuren in die epidermalen interzellulären Lipide integriert werden können (Marsh, 2000).

Der Verlust der epidermalen Barrierefunktion ist eine der ersten Konsequenzen bei einem Mangel an essentiellen Fettsäuren (Friedman, 1980). Während eine Zufuhr von Linolsäure bei fettsäuredefizienten Tieren die Barrierefunktion der Haut wieder herstellt und Erythem und Juckreiz reduziert, kann durch die Zufuhr von Arachidonsäure die Barrierefunktion der Haut nicht wieder hergestellt werden. Der Juckreiz verstärkt sich und die epidermale Proliferation wird reduziert (Hansen und Jensen, 1985).

### **2.4. Eigenschaften der Fettsäuren**

Fettsäuren spielen im Energiestoffwechsel eine wichtige Rolle. 57 % der Energie im Herzmuskel wird durch Fettsäuren geliefert, im Vergleich dazu 20 % durch Glukose und 18 % durch Milchsäure.

Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren sind die Vorläufermoleküle der Eicosanoide, aus denen die Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene gebildet werden. Sie regulieren als intrazelluläre Signalmoleküle und Gewebshormone viele Zellfunktionen.

### **2.4.1. Allgemeine Eigenschaften**

Die biologisch bedeutenden Fettsäuren sind Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren. Sie sind wichtig für eine strukturelle Integrität von Membranen, für den Cholesteroltransport, für die Instandhaltung der Wasserpermeabilität der Haut und für die Bildung von Eicosanoiden (Sinclair, 1990, Ziboh, 1989). Beide Fettsäuren-Gruppen werden durch das Enzym Delta-6-Desaturase in  $\gamma$ -Linolensäure umgewandelt. Dieses Enzym wird durch verschiedene Umwelteinflüsse inhibiert, beispielsweise durch ein Insulindefizit, Alterungsprozesse, Proteine, Ascorbinsäure, Pyridoxine, Zink, Cholesterol, Alkohol, Glukose, gesättigte Fettsäuren, Adrenalin, Thyroxin und Glukokortikoide (Sinclair, 1990). Die Eicosanoide, besonders die proinflammatorischen Leukotriene und Prostaglandine, sind für die charakteristischen klinischen Symptome der AD verantwortlich (Horrobin, 1989, Isseroff, 1988, Schaffer, 1989, Ziboh, 1989). In einem Übersichtsartikel über humane AD wurde die Hypothese geäußert, dass ein Mangel an Delta-6-Desaturase mit einem resultierenden Mangel an Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure einhergeht. In Folge dessen entsteht ein Mangel an Leukotrienen und Prostaglandinen ( $\text{PGE}_1$ ). Aus einem Mangel an  $\text{PGE}_1$  könnte eine defekte T-Lymphozytendifferenzierung, eine unterdrückte zellmedierte Immunität und eine unkontrollierte B-Lymphozyten-Antwort resultieren. Unter diesen Gesichtspunkten könnte man die AD als eine metabolische Dysfunktion mit immunologischen Störungen als Epiphänomen betrachten. Eine ähnliche Hypothese wurde auch für die CAD aufgestellt (Muller, 1989, Reedy, 1989).

### **2.4.2. Eicosanoide**

Durch die Zunahme an entzündungshemmenden Eicosanoiden und die Abnahme an entzündungsfördernden Entzündungsmediatoren kommt es zur Minderung der Hautentzündung. In zwei Studien wurden Hunde mit einem erniedrigten Omega-6:Omega-3-Fettsäuren-Verhältnis und einem höheren Gehalt an Omega-3-Fettsäuren gefüttert. Durch die gesteigerte Aktivität neutrophiler Granulozyten konnte eine verminderte Konzentration und Produktion an in der Dermis vorkommenden  $\text{LTB}_4$  beobachtet werden (Bryne, 2000, Vaughn, 1994).

Die Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure ist die Vorstufe der Prostaglandine und Leukotriene, welche eine wichtige Rolle bei Entzündungen und der Regulation der Immunantwort darstellen. Fischöl enthält die Omega-3-Fettsäure Eicosapentaensäure. Durch die Fütterung von Fischöl kommt es zum Einbau von EPA in die Zellmembran (anstelle von Arachidonsäure). Dies führt zu einer verminderten Produktion an proinflammatorischen Entzündungsmediato-

ren. EPA kann zusätzlich durch die Enzyme 5-Lipooxygenase und Cyclooxygenase zu entzündungshemmenden Eicosanoiden abgebaut werden.

LTB<sub>4</sub> ist ein proinflammatorisches Eicosanoid, welches von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen oder bei zellulären Schädigungen in der Epidermis synthetisiert wird. Es hat einen stark ausgeprägten chemotaktischen Reiz auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten und wird als ein wichtiger Faktor in der Pathologie von verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen bei Menschen und Hunden beschrieben. LTB<sub>4</sub> wird aus der Arachidonsäure (AA) synthetisiert, nachdem diese aus einem Phospholipidgerüst der Zellmembran abgebaut wurde. Die Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysiert die AA, welche anschließend als Substrat für die 5-Lipooxygenase für die Bildung von Leukotrienen zur Verfügung steht. Zusätzlich dient sie als Substrat für die Cyclooxygenase zur Bildung von Prostaglandinen (siehe Abb. 2-1).

Bei Juckreiz und atopischer Haut ist häufig die Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität erhöht (Forster et al., 1985). Zusätzlich weist die Haut von betroffenen Patienten hohe Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> auf (Ruzicka et al., 1986).

Die Pathogenese der atopischen Dermatitis des Menschen ist nicht vollständig auf Hunde übertragbar. Beim Menschen wird vermutet, dass Leukotriene eine wichtige Rolle in der Pathogenese darstellen. In verschiedenen Studien wird von positiven Effekten durch die Verabreichung von essentiellen Fettsäuren auf die Konzentration von Leukotrienen bei Menschen berichtet (Gimenez-Arnau et al., 1997, Wright und Burton, 1982). In der Humanmedizin können Leukotrien-Inhibitoren therapeutisch eingesetzt werden (Carucci et al., 1998), in der Tiermedizin zeigen sie allerdings keine Wirkung (Senter et al., 2002) und werden nicht zur Therapie dieser Erkrankung empfohlen (Olivry und Mueller, 2003). Die Juckreizreduzierung ist wahrscheinlich nicht allein auf die Hemmung der LT-Synthese zurückzuführen. Weder die Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> noch an LTB<sub>4</sub> sanken nach Fettsäuren-Supplementierung signifikant. Folglich spielen PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> nicht die einzige wesentliche Rolle in der Pathogenese der CAD, der assoziierten Hautentzündung und der Juckreizsymptomatik (Mueller et al., 2005b).

Mastzellen schütten nach nichtimmunologischen Stimulationen signifikante Mengen an Zytokinen wie IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 und TNF- $\alpha$  aus (Galli et al., 1991). Zytokine und Leukotriene bewirken eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen an der Stelle

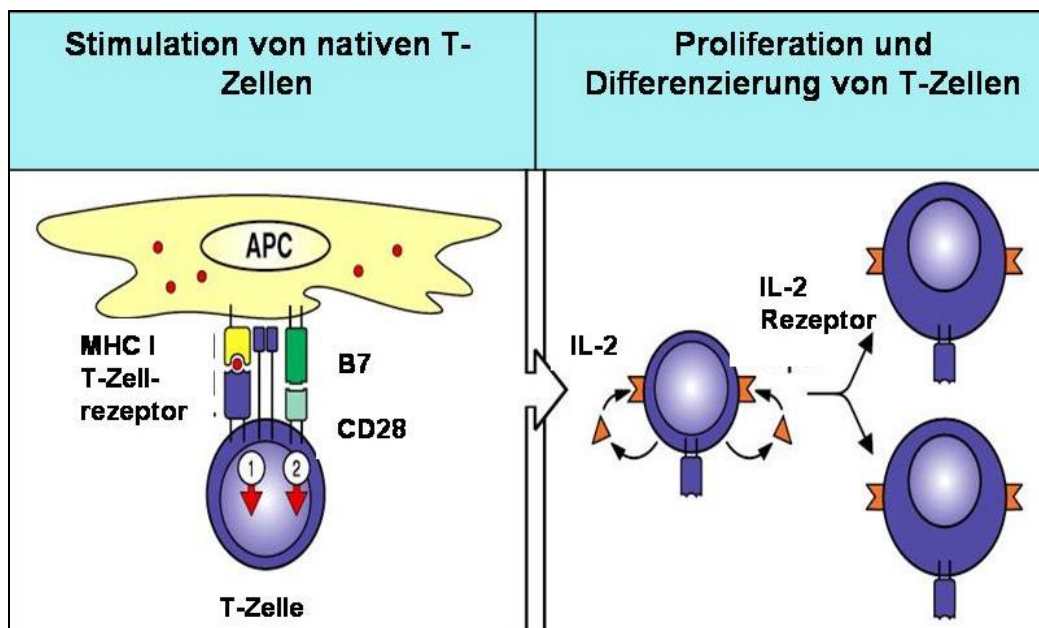
der Allergenexposition. Speziell LTB<sub>4</sub> sendet starke chemotaktische Reize für neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und mononukleäre Zellen aus (Dahlen et al., 1981, Gruber et al., 1989, Palmblad et al., 1981, Strom und Thomsen, 1990). Die Beobachtung, dass LTB<sub>4</sub> mononukleäre Zellen anzieht, hat zu der Hypothese geführt, dass die Infiltration von mononukleären Zellen auf die hohe LTB<sub>4</sub>-Konzentration zurückzuführen ist (Ruzicka, 1989, Ruzicka et al., 1986).

Eine Vielzahl der immunologischen Abnormalitäten, wie beispielsweise eine sinkende zelluläre Immunität und eine verringerte Anzahl an T-Suppressor-Lymphozyten, wurden bei Menschen mit atopischer Dermatitis beschrieben (Campbell, 1990). Es wird vermutet, dass beschriebene Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> in der Haut eine Hautentzündung initiieren und T-Helferzellen vermehrt gebildet werden.



### 2.4.3. Immunmodulation

Bei der humanen atopischen Dermatitis werden die Antigene nativen T-Zellen durch Antigen präsentierte Zellen (APC) präsentiert. APCs binden über den Haupthistokompatibilitätskomplex und B7 als kostimulatorisches Molekül an den T-Zellrezeptor und CD28-Liganden. Diese aktivierten T-Zellen sezernieren IL-2 und binden zusätzlich freies IL-2 an ihre IL-2-Rezeptoren. T-Zellen haben nun die Fähigkeit zur Differenzierung.



**Abb. 2-4:** Native T-Zellen werden durch APCs zur Differenzierung angeregt (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

In verschiedenen Versuchen konnte durch eine Fettsäuren-Supplementierung ein positiver Effekt auf das Immunsystem bei Menschen und Tieren nachgewiesen werden (Chandra, 1989). Fettsäuren üben einen großen Einfluss auf die zellmedierte Immunität (Hemmung der Transformation von T-/B-Zellmitogenen und -antigenen, zelluläre Zytotoxizität gegen allo-genetische Zellen, Monozytenfunktion und Antigen präsentienden Zellen) und die humorale Immunität (verminderte Produktion von Autoantikörpern) aus (Hwang, 1989, Kelley et al., 1991). Eine verringerte Antigenpräsentation und T-Zellaktivität sowie eine verringerte entzündungsfördernde Zytokinexpression in die Haut sind vermutlich die Gründe für eine verbesserte klinische Symptomatik nach Verabreichung von Fettsäuren bei CAD (Mueller et al., 2005b, Mueller et al., 2004) und immunologischen Dysregulationen (Arthritis, autoimmune Nephritis, Psoriasis, ulzerative Kolitis) (Chandra, 1989).

#### **2.4.4. Essentielle Fettsäuren und das Second-Messenger System**

Das Grundprinzip des Second-Messenger-Systems beruht auf der signalmedierte Hydrolyse der Membranphospholipide, der direkten Wirkung der aktivierten Enzymsysteme auf Zellen (Second Messenger) und auf der indirekten Aktivierung eines Third-Messenger-Systems (Burgess et al., 1984). Durch diese Mechanismen aktivierte Messenger sind Prostaglandine, Inositol-Triphosphat, Diacylglycerol und Proteinkinase C. Ein höchstwahrscheinlich häufiger Pathomechanismus ist die Aktivierung des Phosphatidylinositols und dessen Rezeptoren. In der Folge wird eine Sezernierung von Histaminen, Adrenalin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin ausgelöst (Nishizuka, 1984).

Bei einem Mangel an essentiellen Fettsäuren kommt es zuerst zu einer Veränderung der Aktivität des Membran-assoziierten Enzyms Adenylcyclase (Engelhard et al., 1976). Eine  $\beta$ -adrenerg stimulierte Adenylcyclase ist bei Tieren reduziert, sofern diese einen Mangel an essentiellen Fettsäuren haben oder ihnen *trans*-Isomere gefüttert wurden (Alam et al., 1987, Alam et al., 1989). McMurchie *et al.* (1988) zeigten, dass eine Verabreichung von Omega-3-Fettsäuren an Membranen des Herzens die Ausschüttung von Isoprenalin stimuliert und dieses wiederum die Adenylcyclase aktiviert (McMurchie et al., 1988). In anderen Membranen scheint die Anwesenheit von essentiellen Fettsäuren einen gegenteiligen Effekt zu haben, so dass eine Anreicherung von essentiellen Fettsäuren die Aktivität der Adenylcyclase reduziert (Morson und Clandinin, 1986, Neelands und Clandinin, 1983).

Enzymaktivitäten ändern sich ebenfalls, wenn sich die Zusammensetzungen der Fettsäuren in der Zellmembran verändern. In zwei Studien wurde durch den vermehrten Anteil an essentiellen Fettsäuren eine reduzierte Aktivität an  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Bloj et al., 1973, Murphy, 1990) und in einer anderen Studie eine reduzierte Aktivität an  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bei eine Fettsäure-Mangel festgestellt (Brivio-Haugland et al., 1976).

#### **2.4.5. Wirkung auf die Zellmembran**

Basierend auf Versuchen an Menschen und Tieren konnte durch Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung ein direkter Einfluss auf die Zellmembran beobachtet werden. Ausgelöst wurde die Membranveränderung und die daraus resultierende Immunmodulation durch eine Strukturänderung der Phospholipide. Daraus folgte eine Veränderung von Rezeptoren und damit der Signaltransduktion während der Zellaktivität (Salem, 1986).

Neben ihrem Einfluss auf die Phospholipidmembran und den Metabolismus der Archidonsäure können die Fettsäuren auch einen profunden Effekt auf die Synthese von Zytokinen, sowohl direkt als auch indirekt durch die Beeinflussung der Eicosanoidproduktion ausüben (Endres et al., 1989, Meydani, 1992, Molvig et al., 1991, Santoli und Zurier, 1989, Sierra et al., 1992, Virella et al., 1989).

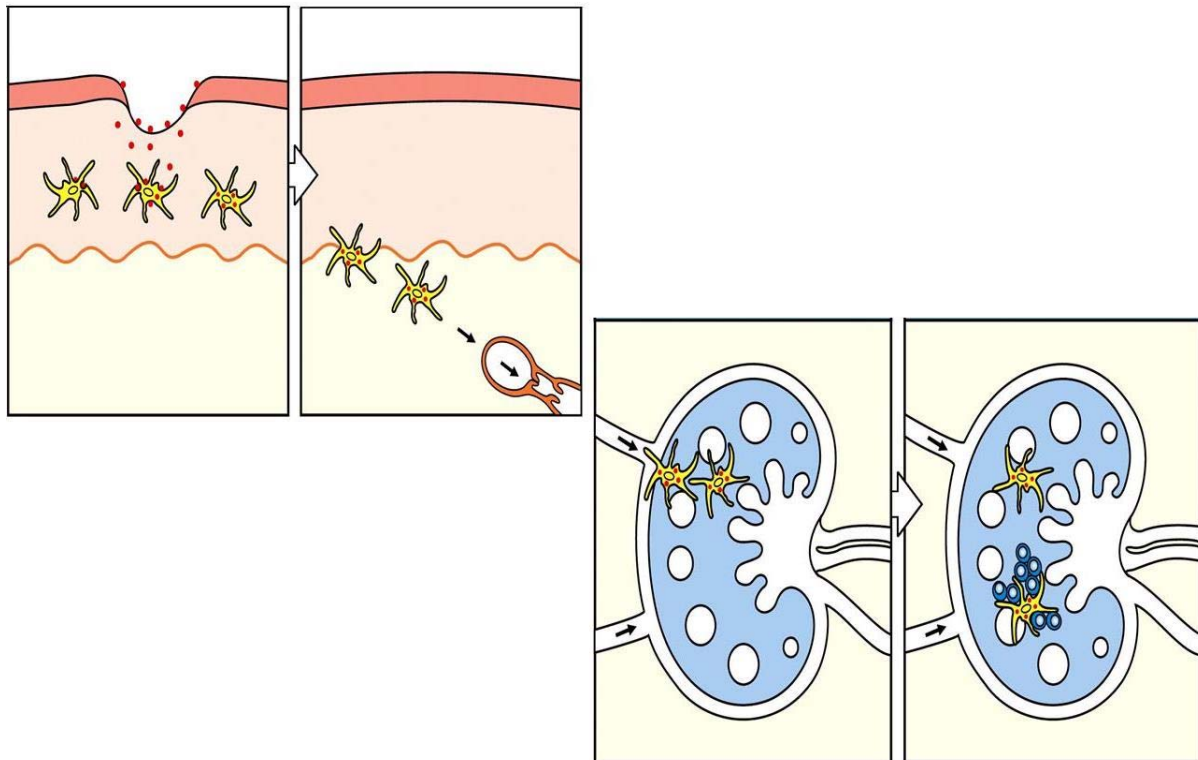
### **2.5. Immunologische Zusammenhänge**

#### **2.5.1. Immunpathologie**

Die Pathophysiologie der AD beinhaltet eine komplexe Verknüpfung zwischen genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen, infektiösen Agentien, Defekten in der epidermalen Barriere und der Immunantwort (Novak et al., 2003a). Aktivierte T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Keratinozyten, Mastzellen und eosinophile Granulozyten repräsentieren das charakteristische Bild einer atopischen Dermatitis.

#### **2.5.2. Antigen präsentierende Zellen**

IgE wird auf der Oberfläche von Mastzellen präsentiert. An IgE und an der Oberfläche von kutanen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) werden Antigene gebunden. APCs werden auch als dendritische Zellen oder Langerhans Zellen bezeichnet. Sie sind Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie und haben die Funktion der Bindung und Beseitigung von Fremdantigenen. Sie präsentieren diese dem Immunsystem und leiten eine immunologische Reaktion ein (siehe Abb. 2-5).



**Abb. 2-5: Langerhanszellen können epidermal penetrierende Antigene aufnehmen, zu peripheren Lymphknoten migrieren und diese Antigene den T-Zellen präsentieren. (modifiziert nach Janeway, 2005, 6.Auflage)**

Es gibt zwei Arten von FcεRI-tragenden myeloiden dendritischen Zellen, welche in veränderter Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis nachgewiesen wurden: Langerhanszellen und entzündliche dendritische epidermale Zellen (inflammatory dendritic epidermal cells, IDECs). Beide haben unterschiedliche Funktionen in der Pathophysiologie der AD. Langerhanszellen spielen eine dominante Rolle in der Initiation der allergischen Immunantwort und aktivieren native T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen, welche hohe Mengen an IL-4 produzieren können. Diese hohe Expression an IL-4 stellt die Initialphase der AD dar (Novak et al., 2004). *In vitro* konnte durch die Stimulation des FcεRI-Rezeptors der dendritischen Zellen durch die Allergene chemotaktisch Signale, sowie eine Neubildung von Präkursorzellen von IDECs und T-Zellen induziert werden.

APCs, welche IgE-Moleküle auf ihrer Oberfläche gebunden haben, induzieren eine gesteigerte IgE-Produktion und Hypersensitivitätsreaktionen. In der Haut von atopischen Menschen und Hunden sind eine gesteigerte IgE-Bindungskapazität der dendritischen Zellen und eine gesteigerte Expression von IgE-Rezeptoren nachweisbar. Die Prävalenz dieser IgE-tragenden Zellen korreliert mit den vorhandenen IgE-Spiegeln (Olivry et al., 1996, Olivry et al., 1997).

### **2.5.3. Rolle der Keratinozyten**

Keratinozyten können durch Trauma, UV-Licht oder Irritation aktiviert werden und über 30 Zytokine oder verwandte Moleküle ausschütten (Uchi et al., 2000). Diese Moleküle stimulieren die APC-Aktivität und -Migration, sind aber allein nicht ausreichend um Entzündungszellen zu rekrutieren.

Aktivierte Keratinozyten sind in der Lage, antimikrobielle Substanzen ( $\beta$ -Defensin und Cathelicidin) zu synthetisieren. Beide Substanzen sind wichtige Bestandteile der antimikrobiellen Abwehr und scheinen für die Resistenz gegenüber Hautinfektionen mitverantwortlich zu sein. In einer Studie wurde bei AD-Patienten eine reduzierte Defensinproduktion und eine vermehrte bakterielle Besiedelung festgestellt (Ong et al., 2002). Bei Hunden wurden bisher noch keine vergleichbaren Studien durchgeführt. Erhöhte Sekretionen von IL-1 und TNF- $\alpha$  aus Keratinozyten wurden bei Patienten mit AD nachgewiesen. Es wird vermutet, dass dies durch eine Dysregulation der Signaltransduktion in diesen Zellen ausgelöst wird (Pastore et al., 2000). Darauf basiert die Hypothese, dass ein Teil der Pathogenese der AD aufgrund intrinsischer Defekte der epidermalen Zellen selbst ausgelöst wird.

### **2.5.4. Zytokine**

Die Hautläsionen werden durch proinflammatorische Zytokine und Chemokine vor Ort ausgelöst (Leung et al., 2004). Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 werden von bestimmten Zellen (Keratinozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen) exprimiert, binden an Rezeptoren am Endothel der Blutgefäße, aktivieren die Signaltransduktion und induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Entzündungszellen können an die Endothelien binden und gelangen in den Extrazellulärraum. Sie wandern entlang des durch Zytokine und Chemokine entstehenden chemotaktischen Gradienten in das Gewebe ein. Aus diesem Grund spielen Zytokine eine zentrale Rolle bei der Infiltration von Entzündungszellen in die Haut atopischer Patienten.

Der Beginn der akuten Phase der AD ist assoziiert mit der Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen, insbesondere von IL-4 und IL-13. Die Expression dieser Zytokine ist bei Patienten mit AD signifikant höher als bei gesunden Probanden (Hamid et al., 1994). Bestimmte Isotypen haben einen Einfluss auf die IgE-Synthese und steigern die Expression von Adhäsionsmolekülen an endothelialen Zellen. IL-5 dagegen wirkt an der Bildung von eosinophilen Granulozyten mit und ist vermehrt bei chronischen Formen der AD vorhanden (Hamid et al., 1994).

Zytokine locken Entzündungszellen sechs bis zwölf Stunden nach der Bindung von Antigen an aktivierte Mastzellen lokal ins entzündete Gewebe. Anschließend persistieren die Zellinfiltrate für einige Tage. Diese sogenannte Spätphasenreaktion ist Teil der Entzündungskaskade und ist verantwortlich für die langandauernde Hautentzündung. Die chronisch entzündlichen Läsionen der Haut bei AD Patienten werden durch sie verursacht.

#### **2.5.5. IgE und IgE-Rezeptoren**

Allergologen haben in der Humanmedizin zwei verschiedene Formen der AD identifiziert. Bei der extrinsischen Form konnte ein familiärer genetischer Zusammenhang und ein positiver Hauttest bzw. Serum-allergen-spezifischer IgE-Test nachgewiesen werden. Bei der intrinsischen Form haben die Patienten identische klinische Symptome sowie eine familiäre genetische Komponente, hatten aber kein nachweisbares Allergen-spezifisches IgE (Novak et al., 2002). 30 % aller Patienten mit AD erkranken an der intrinsischen Form. Dieser Subtyp der AD hat häufig eine späte Manifestation (nach 20 Jahren) (Novak und Bieber, 2003, Schmid-Grendelmeier et al., 2001). Eine Expression des IgE-Rezeptors konnte in epidermalen Hautläsionen von Menschen mit AD festgestellt werden. Eine höhere IgE-Bindungskapazität der dendritischen Zellen in der Haut und im peripheren Blut der Patienten mit AD ist vorhanden (Novak et al., 2003b).

### **2.5.6. Delta -6-Desaturase-Mangel**

Eine reduzierte Konversion von LA zu GLA auf Grund des Mangels an Delta-6-Desaturase wird als eine der zu Grunde liegenden Ursachen der humanen Atopie vermutet (Manku et al., 1982). Diese Hypothese wurde auf Grund des Nachweises niedriger Konzentrationen an GLA und AA und hohen Konzentrationen an LA bei Individuen mit AD gestellt (Manku et al., 1982).

Saevik *et al.* (2002) untersuchten in einer Studie Hunde mit atopischer Dermatitis im Zusammenhang mit einem eventuellen pathologischen Fettmetabolismus und einer reduzierten Desaturaseaktivität. Bei Hunden mit atopischer Dermatitis sowie bei gesunden Hunden wurden Fettsäurespiegel im Serum verglichen. Es konnten keine Unterschiede gesehen, und somit kein Mangel an Delta-6-Desaturase bei atopischen Hunden nachgewiesen werden (Saevik et al., 2002).

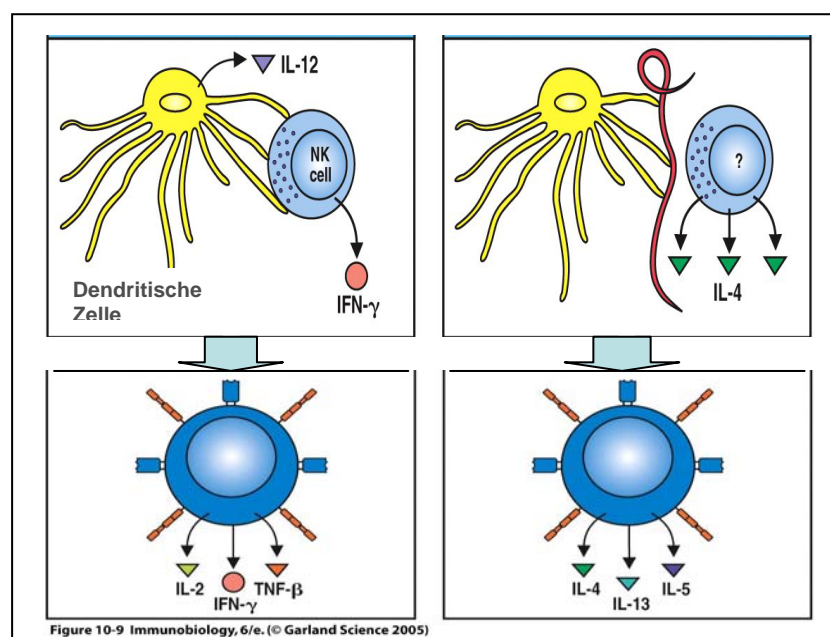
### **2.5.7. Genetik und Umwelteinflüsse**

Extensive epidemiologische Untersuchungen zeigten eine genetische Beteiligung in der Prävalenz dieser Erkrankung beim Menschen. Genetische Veränderungen entwickeln sich aus Interaktionen von Gen zu Gen und von Gen zu Umwelt. Eine ursprüngliche Hypothese wurde durch molekulare genetische Studien belegt. In diesen Studien konnte eine Assoziation zwischen atopischen Phenotypen, verschiedenen chromosomalen Regionen und spezifischen Genen aufgezeigt werden (Cookson, 1994, Cookson, 1998, Cox et al., 1998, Deichmann et al., 1998, Forrest et al., 1999, Leung und Bieber, 2003, Novak et al., 2002, Schafer et al., 1997). Keiner der genetischen Faktoren oder Loci erklärt die Entstehung einer AD bei allen Patienten. Dies zeigt, dass der genetische Hintergrund wichtig, aber nicht ausreichend ist, um eine AD zu verursachen. Die meisten der Studien beziehen sich auf die IgE-Spiegel. Diese sind nur ansatzweise spezifisch für eine Manifestation von AD (Wollenberg und Bieber, 2000). Eine Vielzahl von Studien dokumentiert eine höhere Prävalenz von AD in Regionen mit hohen hygienischen Standards und Gesundheitsvorsorgen. Die 'Hygiene-Hypothese' besagt, dass eine Exposition des Immunsystems mit Pathogenen-assoziierten Molekularmustern („pathogen-associated molecular patterns“) eine wichtige Voraussetzung zur Entwicklung eines normalen Immunsystems ist und dass das Fehlen einer solchen Exposition in den ersten Monaten und Jahren des Lebens die Wahrscheinlichkeit von Aberrationen des Immunsystems erhöht. In der frühen Kindheit wechselt die Immunantwort vom T<sub>H</sub>2-beeinflussten Phenotyp

zu einer relativen  $T_H1$  Dominanz (Holt et al., 1997). Bei atopischen Kindern kann im Vergleich zu gesunden Kindern eine erhöhte  $T_H2$ -Antwort ausgelöst werden (Prescott und Holt, 1998, Schafer et al., 1997). Die gestiegene Prävalenz der atopischen Dermatitis zeigt, dass die Umweltfaktoren eine größere Rolle als die genetischen Faktoren spielen.

## 2.6. Zytokine und Atopie

Zytokine werden nach Kontakt mit Antigenen synthetisiert. Verschiedene Zytokine lösen unterschiedliche Reaktionsmechanismen aus, so dass durch Kontakt mit Antigenen eine Entzündungs- oder immunologische Reaktion induziert wird. Zytokine sind Polypeptide und werden von Zellen der angeborenen oder erworbenen Immunantwort synthetisiert. In der Aktivierungsphase der erworbenen Immunantwort stimulieren sie das Wachstum und die Differenzierung der Lymphozyten. In der Reaktionsphase der angeborenen und erworbenen Immunantwort werden verschiedene Effektorzellen zur Eliminierung von Antigenen aktiviert.



**Abb.2-6:** Links: Dendritische Zellen sezernieren nach Antigenkontakt IL-12. Dies induziert die Synthese von IFN- $\gamma$  in natürlichen Killerzellen. Native  $CD4^+$  T-Zellen werden durch die Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  zur  $T_H1$ -Zelldifferenzierung angeregt. Rechts: Gleichzeitig werden durch Antigenkontakt IL-12 von dendritischen Zellen sezerniert und eine Ausschüttung von IL-4 induziert. Native  $CD4^+$  T-Zellen werden durch die Anwesenheit von IL-4 zu  $T_H2$ -Zellen aktiviert (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage).



Ein Ziel dieser Studie war, den Einfluss von PUFAs auf die Expression von IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  zu erforschen. Um die Effekte und Wirkungen deuten zu können, ist es von Bedeutung, die Eigenschaften dieser Zytokine im Organismus zu kennen.

### **2.6.1. Interleukin-4**

Die Bildung von IL-4 ist entscheidend für die Entstehung von Allergien. IL-4 ist der bedeutendste Mediator für die Produktion von IgE-Antikörpern und für die Entwicklung von T<sub>H</sub>-2-Zellen aus nativen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die wichtigsten IL-4-produzierenden Zellen sind CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der T<sub>H</sub>2-Untereinheit, aktivierte Mastzellen und basophile Granulozyten.

IL-4 hat drei wesentliche Eigenschaften:

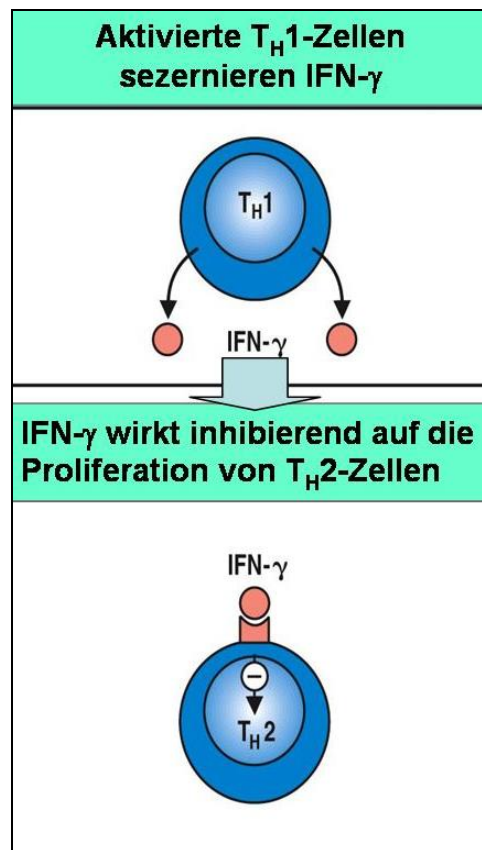
1. Es stimuliert den Umbau der schweren Kette des B-Zell-Immunglobulins zum IgE-Antikörper (IgE-AK). IgE ist unter anderem ein Mediator bei Hypersensitivitätsreaktionen.
2. IL-4 fördert den Umbau von nativen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen und fungiert als autokrines Wachstumshormon für differenzierte T<sub>H</sub>2 Zellen.
3. IL-4 antagonisiert die Makrophagen-aktivierende Wirkung von IFN- $\gamma$  und inhibiert somit die zellmedierte Immunreaktion.

### **2.6.2. Interferon- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  ist ein bedeutendes Zytokin der angeborenen und erworbenen zellmedierten Immunantwort. Es ist ein homodimeres Protein und wird von natürlichen Killerzellen, CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen produziert.

Im folgenden Abschnitt werden die fünf Hauptfunktionen von IFN- $\gamma$  beschrieben:

1. IFN- $\gamma$  fördert die Differenzierung von nativen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Untereinheiten und inhibiert die Proliferation von T<sub>H</sub>2 Zellen (siehe Abb.2-7). Ein Teil der T<sub>H</sub>1-Reaktion auslösenden Effekte von IFN- $\gamma$  wird direkt durch aktivierte mononukleäre Zellen ausgelöst, welche IL-12 sezernieren. IL-12 ist ein Zytokin, welches für die T<sub>H</sub>1-Reaktion mitverantwortlich ist (siehe Abb.2-7).



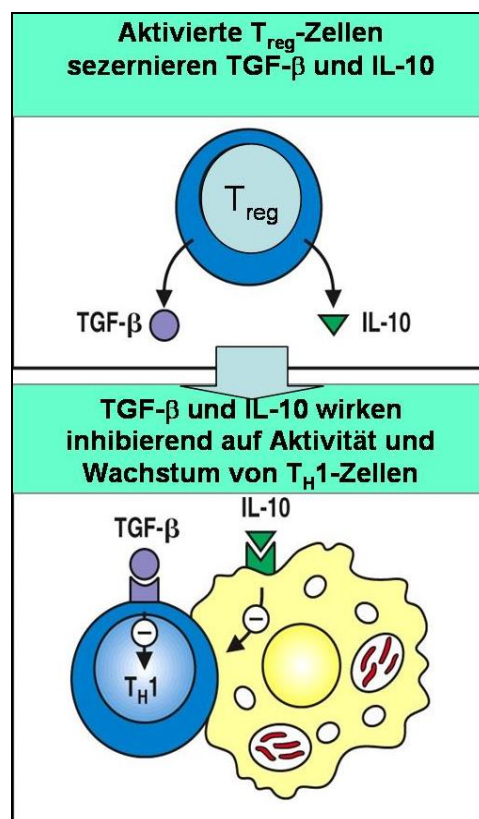
**Abb. 2-7: Aktivierte T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und induzieren eine verringerte Proliferation von T<sub>H</sub>2-Zellen (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage).**

2. IFN- $\gamma$  stimuliert die Expression von Klasse I- und II-MHC Molekülen und ist ein Kostimulator für Antigen präsentierende Zellen. IFN- $\gamma$  steigert die MHC-assoziierte Antigenpräsentation und verstärkt die Reaktion der Immunantwort durch die Expression des Liganden, welcher T-Zellen erkennt.
3. IFN- $\gamma$  hat eine Wirkung auf B-Zellen, indem die Antikörper zu verschiedenen IgG-Subklassen umgewandelt werden. In Mäusen entsteht IgG<sub>2</sub>, welches die Umbildung des IL-4 bildenden Isotyps verhindert.
4. IFN- $\gamma$  aktiviert neutrophile Granulozyten und stimuliert die zytolytische Aktivität von natürlichen Killerzellen.
5. IFN- $\gamma$  fördert die mikrobielle Funktion von Makrophagen durch die Stimulation der Synthese von Nitritoxiden und reaktiven Oxygen-Zwischenstufen. Es beeinflusst die Effekte durch Aktivierung der Transkription entsprechender Gene.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IFN- $\gamma$  makrophagenreiche Entzündungsreaktionen fördert, während IgE-abhängige eosinophilenreiche Reaktionen inhibiert werden.

### 2.6.3. Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

TGF gehört zur Gruppe der regulatorischen durch T-Zellen produzierten Zytokine. Verschiedene nahe verwandte Moleküle werden zu TGF zusammengefasst und als TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 bezeichnet. Einige regulatorische T-Zellen produzieren TGF- $\beta$  und IL-10 und erzielen eine immunsuppressive Wirkung. Zellen des Immunsystems synthetisieren hauptsächlich TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$  inhibiert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, aktiviert Makrophagen und hat einen Einfluss auf die Wirkung von neutrophilen Granulozyten und endothelialen Zellen. Zusätzlich hemmt es proinflammatorische Zytokine. Allgemein formuliert inhibiert TGF- $\beta$  Entzündungsreaktionen und immunologische Vorgänge. Zusätzlich stimuliert TGF- $\beta$  durch „class switching“ von Immunglobulinen die Produktion von IgA.



**Abb. 2-8: Aktivierte regulatorische T-Zellen sezernieren TGF- $\beta$  und IL-10 und unterdrücken die Aktivität und das Wachstum von T<sub>H</sub>1-Zellen (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)**

T<sub>H</sub>2-Zellen induzieren durch IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 die humorale Immunität und IgE-Produktion, welche charakteristisch für die atopische Dermatitis ist. T<sub>H</sub>1-Zellen, welche die Expression von INF- $\gamma$ , IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  induzieren, lösen die zellmedierte Immunität

aus. Das Vorkommen von  $T_H1$ -Zytokinen bei chronischen Läsionen bestätigt eine Beteiligung dieser an der atopischen Dermatitis (Werfel et al., 1996).

Nuttall *et al.* (2002) fanden heraus, dass eine canine atopische Dermatitis mit einer Überproduktion von IL-4 und einer erniedrigten Produktion von TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) in Zusammenhang steht. Eine erhöhte Konzentration von IFN- $\gamma$  konnte bei Hunden mit auftretenden Hautläsionen im Vergleich zu Hunden ohne Hautläsionen und gesunden Hunden ( $p < 0,05$ ) gesehen werden (Nuttall et al., 2002b).

In der vorliegenden Studie sollte nachgewiesen werden, ob essentielle Fettsäuren einen direkten Einfluss auf die Proliferation von PBLs haben. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob essentielle Fettsäuren ihre Wirkung über eine Inhibierung der Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  und einer Steigerung der Expression von TGF- $\beta$  entfalten.

#### **2.6.4. Nachweis von Zytokinen**

Auf Grund geringer Konzentrationen zirkulierender Zytokine, löslicher Zytokin- oder Rezeptorantagonisten und dem Vorkommen biologisch aktiver und inaktiver Formen, ist die Untersuchung des Zytokinexpressionsmusters im Blut sehr schwierig. Der Nachweis von Veränderungen der Zytokinkonzentration im Blut eines Individuums benötigt sensitive Detektionsmethoden. Zytokine haben oft eine sehr kurze Halbwertszeit und sind nicht einfach zu konservieren. Eine sehr bewährte Technik für den Nachweis von Zytokinexpression ist die Detektion ihrer mRNA, welche durch Reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben wird. In der anschließenden quantitativen Polymerase Kettenreaktion werden die Amplifikate detektiert (Chamizo et al., 2001). Die RT-PCR ermöglicht neben der Detektion von mRNA auch deren relative oder absolute Quantifizierung (Bustin, 2000). Allerdings ist nicht in jedem Fall das Vorhandensein von mRNA mit dem Zytokinspiegel gleichzusetzen und deshalb müssen die Ergebnisse solcher Versuche mit Vorsicht interpretiert werden.

#### **2.7. Fettsäuren als Therapie**

Essentielle Fettsäuren werden seit 1987 zur Behandlung der CAD eingesetzt (Bjorneboe et al., 1987). In einer Reihe von Studien konnte die Wirksamkeit zur Reduktion von Entzündungen und Juckreiz nachgewiesen werden (Mueller et al., 2004, Scott, 2001). Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass neben dem Omega-6:Omega-3-Verhältnis, der effektiven

Dosis und der Aufnahmemenge weitere Faktoren einen Einfluss auf die Wirkung von essentiellen Fettsäuren haben (Mueller et al., 2004). Die Pathomechanismen bei Verbesserungen durch die Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung sind teilweise durch die Veränderungen der Eicosanoid-Produktion zu erklären.

Durch die orale Supplementierung von verschiedenen Fettsäuren konnte die Entzündung und der Atopie-assoziierte Juckreiz bei Hunden gemindert werden (Bond und Lloyd, 1992, Logas, 1994, Scott et al., 1992). Deshalb wird eine Supplementierung von Omega-6-Fettsäuren (Gamma-Linolensäure [GLA]) (Scarff und Lloyd, 1992), Kombinationen aus GLA und Omega-3-Fettsäuren (Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA)) (Bond und Lloyd, 1992, Scott et al., 1992, Scott, 2001), variablen Dosen an Omega-3-Fettsäuren (Logas, 1994), mit Omega-3-Fettsäuren supplementierten Diäten oder Diäten mit einem festgesetzten Gehalt an Omega-6:Omega-3-Fettsäuren-Verhältnis (Scott et al., 1997) bei atopischer Dermatitis empfohlen.

Weiterhin schließt das Versagen eines Produktes nicht das Ansprechen auf ein anderes Produkt aus. Daher sind Versuche mit unterschiedlichen Produkten/Medikamenten durchaus sinnvoll (Scott et al., 1992, Scott, 2001). Durch die Kombination mit einem Antihistaminikum (Paterson, 1995), (Paradis, 1991) konnten synergistische Effekte nachgewiesen werden. Diese positiven Effekte sind bei Hund und Katze auch bei der Kombination mit Glukokortikoiden beschrieben (Saevik et al., 2004, Scott, 2001). Die positiven Wirkungen der essentiellen Fettsäuren sind bei Katzen wesentlich deutlicher zu sehen (Harvey, 1993).

Nebenwirkungen sind selten und bestehen zumeist in einem reversiblen Durchfall. Allerdings ist in wenigen Fällen auch von einer Pankreatitis berichtet worden, welche nach Behandlung mit Fettsäuren auftrat (Scott, 2001).

### **III Material und Methoden**

#### **Einschlußkriterien der Hunde**

Für den Proliferationsversuch wurde elf gesunden Hunden und elf Hunden mit atopischer Dermatitis Blut aus der *Vena jugularis* entnommen. Zusätzlich konnte für den Stimulationsversuch zehn Hunden mit atopischer Dermatitis und zehn gesunden Hunden Blut aus der *Vena jugularis* abgenommen werden. Die Diagnose atopische Dermatitis wurde bei diesen Hunden auf Grund des Vorberichtes, des klinischen Erscheinungsbildes, dem Ausschluss von Differentialdiagnosen wie zum Beispiel der Flohbiss- und Futtermittelallergie sowie des Milbenbefalles durch entsprechende Tests und Nachweisverfahren gestellt (DeBoer und Hillier, 2001). Zusätzlich wurden die eine atopische Dermatitis bei diesen Hunden auslösenden Allergene über einen Intrakutan- oder Serum-IgE-Allergentest ermittelt.

Die Besitzer der 21 gesunden Hunde waren Studenten und Mitarbeiter der medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Besitzer der 21 Hunde mit atopischer Dermatitis gehören zum Patientenstamm der Medizinischen Kleintierklinik München.

#### **Zellkultur-Methoden**

##### **3.1. Material**

Material (Lösungen, Verbrauchsmaterial) und Geräte werden in Listen im Anhang aufgeführt.

##### **3.2. Methoden**

###### **3.2.1. Blutentnahme aus der Vena jugularis**

Für die Blutentnahme wurden 20ml-Spritzen und Kanülen unter sterilen Bedingungen mit 1,0 ml Heparinlösung beschichtet. Die Blutentnahme erfolgte nach Hautdesinfektion aus der *Vena jugularis*.

### **3.2.1.1. Vorversuche Blutentnahme**

#### **3.2.1.1.1. Optimierung der Leukozyten-Gewinnung aus Hundeblood**

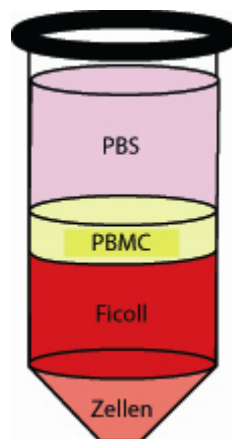
Zu Versuchsbeginn sah der Versuchsaufbau vor, Proliferations- und Stimulationsversuche aus Blut ein und desselben Hundes zu bearbeiten. Beide Versuchsreihen beinhalteten in diesem Protokoll den Ansatz von jeweils fünf Fettsäuren, einer Negativkontrolle, einer alleinigen Allergenkontrolle sowie bei der Proliferation einer zusätzlichen Positivkontrolle (Concanavalin A). Um die Zellen in einer ausreichend hohen Konzentration in den jeweiligen Versuchen proliferieren/stimulieren zu können, war eine Konzentration an peripheren mononukleären Zellen (PBL) von  $2,9 \times 10^8$  Zellen gesamt pro Blutprobenentnahme erforderlich. Da selbst bei Volumina von 60 ml Blut nur bei ca. 50 % der Patienten diese Menge an PBLs isoliert werden konnte, wurden die Proliferations- und Stimulationsversuche aus unterschiedlichen Blutproben durchgeführt. Die Hunde wurden vor der Blutprobenentnahme durch Bewegung, Spiel oder Animation in Aufregung gebracht. Dadurch wurden die Leukozyten vom marginalen Pool in den zentralen Blutstrom geleitet und höhere Konzentration von Leukozyten in der Blutprobe erreicht.

#### **3.2.1.1.2. Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen in Blutproben**

In einem Vorversuch wurden optimale Bedingungen für die Blutprobenentnahme ausgetestet. Die Bedeutung lag in der Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen aus den jeweiligen Blutproben. Der Leukozytengehalt zweier Blutproben wurde im Vergleich ausgewertet. Als Probandin diente eine achtjährige gesunde Podenco-Mischlings-Hündin.

### **3.2.2. Isolierung von Peripheren Blutleukozyten (PBLs)/ Peripheren Mononukleären Zellen (PBMCs)**

Die Aufreinigung von mononukleären Zellen geschah in Anlehnung an Kipar *et al.* (2001) und Leutenegger *et al.* (1999) (Kipar, 2001, Leutenegger, 1999). Sie diente letztendlich zur Bestimmung des Proliferationsindexes der PBLs und der Stimulation von PBLs mit anschließender quantitativen Bestimmung der Zytokin-mRNA von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ,  $\beta$ -Aktin und 18S rRNA. Das heparinisierte Blut wurde mit dem gleichen Volumen phosphatgepufferter Salzlösung (PBS pH 7,2) gemischt und auf den Dichtegradienten Ficoll (Bicoll®; Fa. Biochrom AG, Berlin) im Mengenverhältnis 1:1 geschichtet. Nach zwölfminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 225 x Erdbeschleunigung (g) (1200rpm) ergab sich folgende Schichtung des Röhrcheninhalts:



**Abb. 3-1: Schichtung der verschiedenen Phasen nach Zentrifugation**

Die mononukleäre Zellschicht mit PBLs/PBMCs (weiße Interphase) wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert und in 50 ml PBS überführt. Um Reste des Gradienten vollständig zu entfernen, wurden die PBLs zweimalig mit kaltem PBS für zehn Minuten gereinigt. Dies geschah durch Zentrifugation bei 4° C und 350 x g (1400rpm) beziehungsweise 225 x g (1200rpm).



### 3.2.3. Ermittlung der Zellzahl

Isolierte PBLs wurden in 10 ml PBS resuspendiert. Um die Zellzahl zu ermitteln und tote Zellen anzufärben, wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Der Farbstoff Trypanblau wird passiv durch Diffusion von Zellen aufgenommen. Da lebende Zellen den Farbstoff durch ihre Stoffwechselaktivität sezernieren können, werden sie – im Gegensatz zu toten Zellen – nicht angefärbt. Die ungefärbten Zellen wurden in 80 Kleinstquadraten einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}}$$

Fläche eines Kleinstquadrates: 0,04 mm<sup>2</sup>, Kammertiefe: 0,1 mm, Verdünnung 1:2

### 3.2.4. Proliferationsversuch

Durch diesen Versuch sollte der Einfluss von verschiedenen Fettsäuren und Fettsäurekombinationen auf die Proliferation von Leukozyten erforscht werden. Dazu wurden neben einer Negativkontrolle (Standardmedium) verschiedene Fettsäuren im Vergleich eingesetzt. Die eingesetzten Fettsäuren waren Linolsäure (LA), α-Linolensäure (ALA), γ-Linolensäure (GLA), Eicosapentaensäure/Docosahexaensäure (EPA/DHA) und eine Kombination aus γ-Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure (GLA/EPA/DHA). Die Leukozyten wurden in einer Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml mit einer Negativkontrolle (Standardmedium), Positivkontrolle (Concanavalin A) sowie mit Allergen (*Dermatophagoides farinae*) versetzt. Nach einer 54stündigen Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt wurden die Kavitäten mit radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und weitere 18 Stunden inkubiert. <sup>3</sup>H-Thymidin wird während der DNA-Replikation in der Phase der Zellteilung eingebaut. Die Zellen wurden auf einen Filter übertragen und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Szintillationsflüssigkeit enthält Moleküle, deren Elektronen durch die niedrig energetische Beta-Strahlung des Tritiums [<sup>3</sup>H] in der Atomhülle angeregt werden und auf eine äußere Schale übergehen. Beim Zurückfallen in ihren ursprünglichen Zustand wird die freiwerdende Energie in Licht umgewandelt, welches mit einem Detektor gemessen wird.

### **3.2.4.1. Vorversuche Proliferation**

#### **3.2.4.1.1. Ermittlung einer geeigneten Positivkontrolle**

Als Positivkontrollen für Proliferationsversuche eignen sich Concanavalin A (Con A) und Phytinhaemagglutinin (PHA). In einem Vorversuch wurden in einem Proliferationsversuch Con A (10 µg/ml) und PHA (10 µg/ml) direkt miteinander verglichen. Beide Reagentien wurden mit PBLs eines Hundes (100 µl in Konzentration  $5 \times 10^6$  Zellen/ml) versetzt, zusätzlich mit verschiedenen Fettsäuren und Fettsäurekombinationen (in Konzentration  $10^{-5}$  M) stimuliert und 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 18 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden die Kavitäten mit 20 µl <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und die Lichtstrahlung nach Ende der Inkubationszeit durch einen Beta-Counter gemessen.

#### **3.2.4.1.2. Bestimmung der Fettsäurekonzentration**

In einem weiteren Vorversuch wurden PBLs eines Hundes (100 µl in Konzentration  $5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit verschiedenen Fettsäurekonzentrationen kombiniert und die Proliferation im Beta-Counter gemessen. Es wurden Fettsäurekonzentrationen von  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M für den Vorversuch eingesetzt.

#### **3.2.4.1.3. Bestimmung der Allergenkonzentration**

In dieser Studie sollte nachgewiesen werden, ob essentielle Fettsäuren bei Anwesenheit von Allergenen die Proliferation inhibieren können. Um eine optimale Allergenkonzentration einsetzen zu können, wurden verschiedene Allergenkonzentrationen getestet. Das Allergen lag in einer Konzentration von 40.000 PNU/ml vor. Von diesem Konzentrat wurden 1,5 µl/ml Zellsuspension, 20 µl/ml Zellsuspension und 50 µl/ml Zellsuspension den PBLs zugegeben. Die Allergene wurden ebenfalls mit verschiedenen Fettsäuren und Fettsäurekombinationen (in Konzentration  $10^{-5}$  M) versetzt und die Proliferation mit einer Negativkontrolle verglichen. Die Kavitäten wurden 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, 18 Stunden vor Inkubationsende mit 20 µl <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und anschließend die Lichtstrahlung im Beta-Counter gemessen.

### **3.2.4.2. Durchführung Proliferationsversuch**

In eine sterile 96-Loch-Platte wurde in Reihe A die Negativkontrolle (Standardmedium, 50 µl) und in Reihen B bis H die verschiedenen Fettsäuren (LA, GLA, ALA, EPA/DHA, GLA/EPA/DHA) in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M und einer Menge von 50 µl pipettiert. In die Spalten 1-3 wurde die Negativkontrolle, in die Spalten 4-6 die Positivkontrolle (Con A) und in die Spalten 7-9 das Allergen (*D.farinae*) in Form von Triplikaten in einer Menge von 50 µl/Vertiefung pipettiert. Anschließend wurde in alle Kavitäten die Zellsuspension in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in einer Gesamtmenge von 200 µl eingegeben. Nach 54 Stunden Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt wurden 20 µl <sup>3</sup>H-Thymidin-Gebrauchslösung (1 µCi) in jede Kavität pipettiert und für weitere 18 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Harvester auf Glasfiber Filter übertragen. Nach Trocknen und Einlegen des Filters in eine 96-Loch-Plattenhalterung wurde dieser mit 20 µl Szintillationsflüssigkeit pro Delle benetzt, mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und im Beta-Counter die Lichtstrahlung gemessen. Das Maß der Proliferation wurde in Ausschläge pro Minute (counts per minute, cpm) angegeben.

### **3.2.5. Kultivierung von Zellen für Stimulationsversuch**

#### **3.2.5.1. Vorversuche Stimulation**

##### **3.2.5.1.1. Bestimmung der erforderlichen Zellkonzentration**

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, in welcher Konzentration Zellen kultiviert werden, um bei RNA-Präparationen eine ausreichende Konzentration von 0,4 µg RNA zu erhalten. Es wurden Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml ( $1,5 \times 10^7$  Zellen/3ml) in 6-Loch-Platten eingesät und 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Vergleich wurden aufgetaute Zellen in einer Konzentration von  $8 \times 10^6$  Zellen/ml, frisch präparierte Zellen in Konzentrationen von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml und  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingesetzt.

### **3.2.5.1.2. Inkubation der PBLs über 6, 10 und 18 Stunden**

Im zuvor beschriebenen Versuch konnte gesehen werden, dass bei Inkubationszeiten von 72 Stunden nur ein Bruchteil der Zellen überleben. In der Literatur wurde beschrieben, dass bei Inkubationen über 6 - 24 Stunden ein Großteil der Zellen überlebt und hohe Expressionen an Zytokinen gemessen werden konnten. In diesem Versuch wurden die Veränderungen der Expressionswerte von  $\beta$ -Aktin, IFN- $\gamma$ , IL-4 und TGF- $\beta$  und 18S rRNA nach 6 Stunden, 10 Stunden und 18 Stunden Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> gemessen. Die Inkubationszeit mit der maximalen Expression der entsprechenden Zytokine wurde standardmäßig in den Hauptversuchen eingesetzt.

### **3.2.6. Weiterverarbeitung der PBLs für die RNA-Extraktion**

Für die RNA-Extraktion wurden jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz eingesetzt. Dazu wurden die in PBS aufgenommenen PBLs für zehn Minuten bei 225 x g (1200rpm) zentrifugiert, den Überstand abgekippt und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Die Aufnahme in Einfriermedium ermöglicht es, die PBLs bei -80° C einzufrieren und zu einem späteren Zeitpunkt die RNA zu extrahieren.

### **3.2.7. Stimulation von peripheren Blutleukozyten**

Isolierte PBLs wurden in Standardmedium auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 1 ml Zellsuspension auf 24-Loch-Platten aufgeteilt. In diesem Versuch wurde zur Zellsuspension das Allergen *D. farinae* (50  $\mu$ l einer 40.000 PNU/ml-Konzentrationslösung) und verschiedene Fettsäuren (LA, EPA/DHA, GLA/EPA/DHA) zugegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (Standardmedium) angesetzt. Um die alleinige Wirkung der essentiellen Fettsäuren beurteilen zu können, wurde die Negativkontrolle und das Allergen ebenfalls mit Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem GmbH, Darmstadt, 3,1  $\mu$ l) angereichert. Nach fünf bis sieben Stunden Kultivierung bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> waren stimulierte Leukozyten in unterschiedlichen Mengen mikroskopisch zu erkennen. Das Kulturmedium wurde mit einer 1000 $\mu$ l-Pipette resuspendiert und jeweils in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspensionen wurden für zehn Minuten bei 225 x g (1200rpm) und 4° C zentrifugiert.

### **3.2.8. Mögliche Weiterverarbeitungstechniken**

#### **3.2.8.1.1. Trifast<sup>TM</sup>-Methode**

Dieses Verfahren wurde standardmäßig in diesem Versuch durchgeführt. Der Überstand der Zellsuspension wurde nach dem beschriebenen Zentrifugationsschritt (siehe 3.2.2) abgeschüttelt und das Zellpellet in Trifast<sup>TM</sup> Reagenz (peqGOLD Trifast<sup>TM</sup>, Erlangen) resuspendiert. Trifast<sup>TM</sup> Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Die Zellen sollten durch auf- und abpipettieren ausreichend mit Trifast<sup>TM</sup> gemischt werden.

#### **3.2.8.1.2. Zellen einfrieren**

Nach Präparation der PBLs können diese durch eine RNA-Präparation oder einen Einfriervorgang weiterverarbeitet werden. Vor Einfrieren der PBLs wurde die Zellzahl mikroskopisch bestimmt und die Zellen in einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Einfriermedium in 1,8ml Kryo-Vials aufgeteilt. Diese wurden in einer Einfrierbox, die zur Hälfte mit Isopropanol gefüllt war, bei  $-80^\circ \text{C}$  eingefroren. In dieser Einfrierbox wurde die Temperatur um ca.  $1^\circ \text{C}/\text{min}$  abgekühlt. Bei  $-80^\circ \text{C}$  können Zellen bis zu einem Jahr gelagert werden, zur langfristigen Lagerung empfiehlt sich jedoch flüssiger Stickstoff.

#### **3.2.8.2. Zellen auftauen**

Die Zellen wurden in einem Wasserbad von  $37^\circ \text{C}$  innerhalb von zwei Minuten aufgetaut. Anschließend wurde jeweils 20 ml gekühltes RPMI-1640-Medium in 50ml-Falcons pipettiert. Die Zellsuspension konnte nun in 5ml-Pipetten aufgezogen und langsam zu RPMI-1640-Medium zugegeben werden. Die Lösung aus Zellsuspension und Standardmedium wurde anschließend für zehn Minuten bei  $12000 \times g$  bei  $4^\circ \text{C}$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Anzahl der überlebenden Zellen konnte nun mikroskopisch ermittelt werden (Ermittlung der Zellzahl siehe 3.2.3).

### **3.2.9. RNA-Präparation**

Um Gesamt-RNA aus Zellen zu gewinnen, wurden PBLs mit Trifast™ Reagenz versetzt. Durch Zugabe von Chloroform wurden die organische und die wässrige Phase getrennt und die RNA durch Präzipitation der wässrigen Phase gewonnen.

Beim Arbeiten mit RNA ist grundsätzlich immer an die Gefahr zu denken, dass ubiquitär vorkommende RNasen die RNA degradieren. Man sollte nur mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen arbeiten. Geräte und Gegenstände wurden mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AppliChem GmbH, Darmstadt) für ca. eine Stunde inkubiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser (Wasser für Molekularbiologie, AppliChem GmbH, Darmstadt) abgewaschen oder mit 10%igem SDS (AppliChem GmbH, Darmstadt) abgewischt.

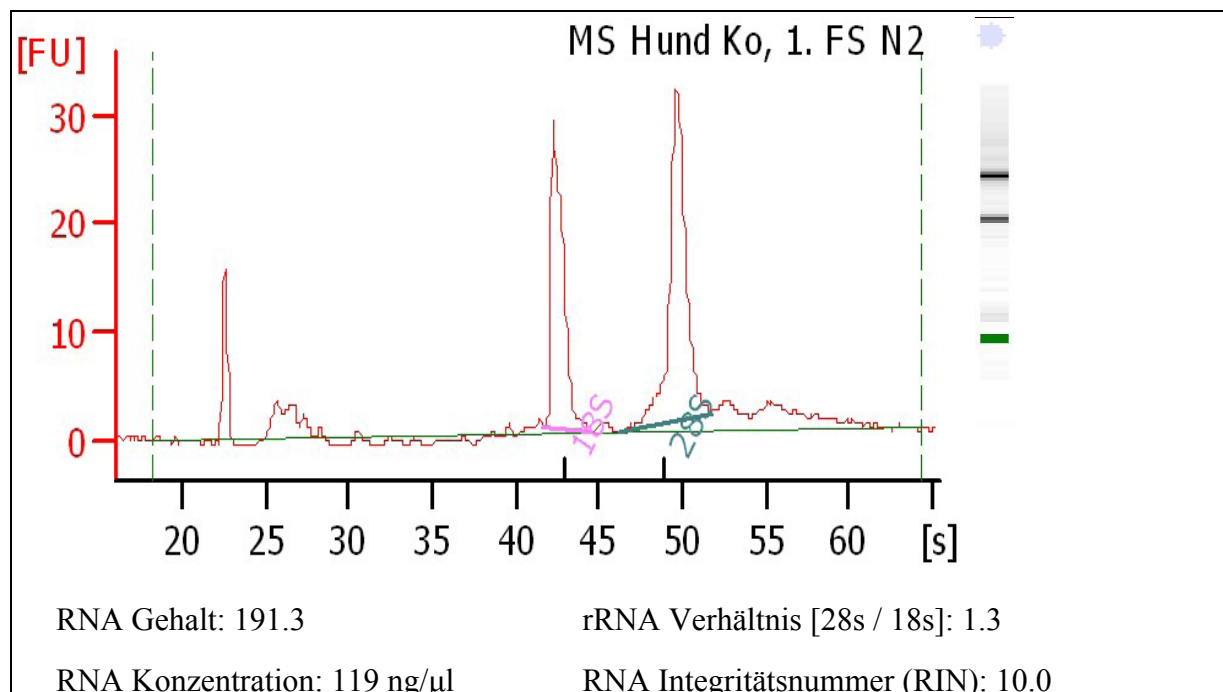
#### **3.2.9.1. Durchführung**

2 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4° C mit 12000 x g pelletiert und in Trifast™ mit Hilfe einer 1000µl-Pipettierhilfe resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sekunden stark geschüttelt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4° C mit 12000 x g teilen sich die Medien in eine obere, wässrige, RNA-haltige Schicht, eine Interphase mit DNA und eine untere, trizolhaltige Phase. Die obere, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt, 500 µl Isopropanol dazupipettiert und zweimalig vorsichtig geschwenkt. Nach einer zehnmünütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch anschließend zehn Minuten bei 4° C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttelt, das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals fünf Minuten bei 4° C mit 7500 x g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und in 15 µl RNase freiem Wasser gelöst. Anschließend konnte die Qualität der RNA im Bioanalyser beurteilt oder die RNA bei -80° C gelagert werden.

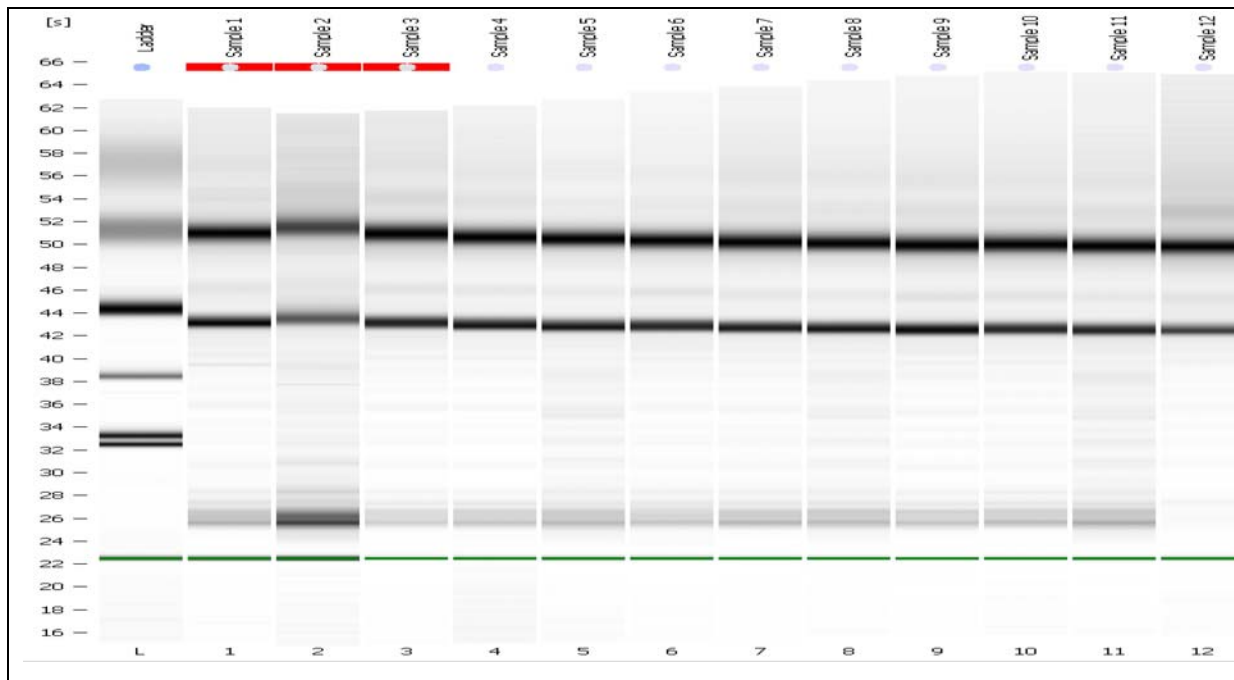
### 3.2.10. Bioanalyser

Im Bioanalyser kann die Qualität der RNA (RNA Integrity Number) und die RNA-Konzentration bestimmt werden. Nur RNA von guter Qualität und entsprechend hoher RNA Integritätsnummer (RIN von 7,5 - 10) wurde in anschließenden Verarbeitungsschritten in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und in dieser Studie verwendeten Agilent RNA 6000 Eukaryonten Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) kann eine Qualitätskontrolle isolierter Gesamt-RNA-Proben durchgeführt werden.

Die auf Elektrophorese basierende LabChip™-Technologie faßt die Schritte der Längenseparation, die Aufnahme und Archivierung des Gelbildes und seine Auswertung zu einem einzigen, schnell ablaufenden Prozess zusammen. Die dabei erzeugten digitalen Ergebnisse sind durch den automatisierten Prozessablauf weniger vom Benutzer beeinflussbar und daher genauer und reproduzierbarer. In der im Folgenden aufgeführten elektrophoretischen Darstellung ist die Aufschlüsselung der Gesamt-RNA in ihre Bestandteile 5s, 18s und 28s RNA zu erkennen.



**Abb. 3-2: Links: elektrophoretische Darstellung von fluoreszierenden Einheiten (FU) aufgeschlüsselter Gesamt-RNA in 5s, 18s, 28s im zeitlichen Verlauf (s). Rechts: spezifische Banden für 5s, 18s, 28s auf einem Agarosegel**



**Abb. 3-3: Graphische Darstellung von Gelbildern. Das erste Gel zeigt die Leiter mit ihren spezifischen Banden, während bei den Proben eins bis zwölf die 18s- und 28s-Banden deutlich als schwarz gefärbte Banden erkennbar sind**

### 3.2.10.1. Durchführung

Alle verwendeten Medien wurden vor Beginn der Bearbeitung der Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt.

#### 1. Vorbereitung des Gels

550  $\mu$ l der RNA 6000 Gel Matrix wurden in einen Spinfilter pipettiert. Das Gel wurde anschließend zehn Minuten bei 1500 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. 65  $\mu$ l des Gels wurden nach der Zentrifugation in ein 0,5ml-RNase freies Eppendorfgefäß überführt und konnte in den folgenden vier Wochen verwendet werden.



## **2. Vorbereitung des Gel-Dye-Mixes**

RNA 6000 Nano Dye Konzentrat wurde für zehn Sekunden geschüttelt, für wenige Sekunden abzentrifugiert und 1 µl des Konzentrates in 65µl des Gels aliquotiert. Anschließend wurde der Gel-Dye-Mix einige Sekunden geschüttelt und für zehn Minuten bei 13000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

## **3. Auftragen des Gel-Dye-Mixes**

Als erster Schritt wurde ein neuer Agilent RNA 6000 Eukaryonten-Kit in die Chip Priming Station eingelegt. 9 µl des Gel-Dye-Mixes wurden in eine speziell markierte Vertiefung pipettiert und die Chip Priming Station geschlossen. Innerhalb von 30 Sekunden verteilte sich das Gel im Chip. Nach Öffnen der Priming Station wurden in zwei weitere Vertiefungen des Kits 9 µl des Gel-Dye-Mixes pipettiert.

## **4. Auftragen des Markers**

In alle zwölf Vertiefungen des Kits, in welche RNA-Proben eingegeben werden können, wurden 5 µl Marker pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl Marker in die Vertiefung für die Leiter pipettiert.

## **5. Auftragen der Leiter und der RNA-Proben**

In die Vertiefung der Leiter wurde 1 µl Leiter pipettiert. In die Vertiefung der RNA-Proben wurden jeweils 1 µl RNA pipettiert. Anschließend wurde der Chip bei 2400 rpm für eine Minute geschüttelt und innerhalb von fünf Minuten in den Agilent 2100 Bioanalyser zur Analyse verbracht.

### **3.2.11. Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Konzentration der gelösten RNA wurde durch photometrische Messung im BioPhotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dabei erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen ein Lösungsmittel (Leerwert für RNA). Zur Messung des Leerwertes wurden 100 µl Aqua bidest. eingesetzt. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Aufschluss über eine Verunreinigung der Nukleinsäure durch Proteine. Reine RNA sollte einen Wert von ca. 2,0 zeigen. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{230}$  schätzt die Reinheit der Probe bezüglich der Verunreinigung durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen und sollte bei ca. 2,2 liegen.

### **3.2.12. QuantiTect® Reverse Transkription**

#### **3.2.12.1. Elimination genomischer DNA**

Aufgereinigte RNA-Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration in bis zu 12 µl RNase freiem Wasser verdünnt. Jeder Probe wurde zusätzlich 2 µl gDNA Wipeout Puffer (siebenfach konzentriert) zugegeben und für zwei Minuten bei 42° C im Thermocycler inkubiert. Dieser Bearbeitungsschritt führte zur Eliminierung einer Kontamination mit genomischer DNA. Die RNA konnte anschließend direkt in cDNA umgeschrieben werden (Reverse Transkription).

##### **3.2.12.1.1. Durchführung**

Folgende Komponenten wurden je Probe in 0,5ml-Eppendorfgefäße zur Eliminierung genomischer DNA zugegeben:

gDNA Wipeout Puffer:	2 µl
RNA:	variabel * <sup>1</sup>
<u>RNAse freies Wasser:</u>	<u>variabel</u>
Gesamtvolumen:	14 µl

\*<sup>1</sup> 0,4µg rRNA, mRNA und CarrierRNA, abhängig von photometrischer RNA-Messung

#### **3.2.12.2. Reverse Transkription (RT)**

Für eine Quantifizierung einzelner mRNA-Fraktionen aus mononukleären Zellen mittels „Real Time“-PCR musste zunächst die extrahierte Gesamt-RNA in cDNA umgewandelt werden. Hierzu wurde das Reagenziensystem Reverse Transkription mit QuantiTect® Reagenz (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. In diesem System sind sogenannte Random Hexamer Primer enthalten. Dies sind kurze, nach dem Zufallsprinzip synthetisierte Oligonukleotide, die statistisch verteilt an die gesamte RNA (rRNA, tRNA, mRNA) hybridisieren, so dass die cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase abschnittsweise gebildet wird. Im Gegensatz zu Oligo-dT Primern, die sich an das Poly-A-Ende der mRNA anlagern und damit nur mRNA umschreiben, ermöglicht die Verwendung dieser Random Hexamer Primer den Einsatz von 18S rRNA als interne Kontrolle.

Folgender Reaktionsansatz wurde laut Herstellerangaben zur reversen Transkription verwendet

(Ansatz pro umgeschriebene RNA-Probe):

Quantiscript Reverse Transkriptase:	1 $\mu$ l
Quantiscript RT Puffer:	4 $\mu$ l
RT Primer Mix:	1 $\mu$ l
<hr/>	
Menge RNA:	14 $\mu$ l

Die Eliminierung der genomischen DNA und die Reverse Transkription wurden im Thermocycler GenAmp 2400 nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

- Eliminierung genomischer DNA: 2 min bei 42° C
- Reverse Transkription: 30 min bei 42° C
- Inaktivierung des Enzyms: 3 min bei 95° C
- Abkühlung auf 4° C

Die cDNA-Proben konnten anschließend bei -20° C eingefroren oder direkt zur Zytokinbestimmung in der quantitativen Polymerase Kettenreaktion verwendet werden.

### **3.2.13. Etablierung der Primer**

Als Primer wird in der Molekularbiologie ein Oligonukleotid bezeichnet, das als Startbereich für DNA-replizierende Enzyme (DNA-Polymerasen) dient. DNA-Polymerasen benötigen eine Hydroxylgruppe als Startpunkt für ihre erste Verknüpfungsreaktion. Primer stellen mit ihrem 3'OH-Ende eine passende Hydroxylgruppe zur Verfügung.

Für die PCR wurden Nukleotidsequenzen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, bestimmt. Gemäß diesen Sequenzen wurden passende Primersequenzen synthetisch hergestellt. Alle eingesetzten Primer hatten eine Basenpaarlänge (bp) von 18 - 24 bp. Mit der Länge eines Primers wächst die Annealing Temperatur eines Primers linear an. Bei der Annealing Temperatur hybridisiert ein Primer mit der Proben-DNA. Ist die Annealing Temperatur zu hoch (über 80° C), werden die verwendeten Enzyme (DNA-Polymerasen)

denaturiert. Ist die Temperatur zu niedrig (unter 55° C), können die Primer unspezifisch an nichtspezifische DNA-Sequenzen binden. Die Annealing Temperatur lag bei allen verwendeten Primern bei 59° C.

Die Annealing Temperatur eines Primers hängt allerdings nicht nur von seiner Länge ab, sondern auch von seiner Nukleotidzusammensetzung. Guanin-Cytosin-Basenpaare werden durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert, Thymin-Adenin-Basenpaarungen nur über zwei. Guanin-Cytosin-Basenpaarungen sind somit „stabiler“. Die Annealing Temperatur nimmt dementsprechend mit der Anzahl an Guanin- und Cytosin-Nukleotiden zu.

### **3.2.13.1. Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen**

#### **3.2.13.1.1. Blast**

Das Programm ist unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) frei verfügbar. Von Bedeutung ist die Bindung des Primers an das „gen of interest“, welches eine hochspezifische Bindung verdeutlicht. Die Sequenz von Primern wird mit ähnlichen oder gleichen Sequenzen verglichen. Während dessen wird überprüft, ob der Primer andere Genabschnitte außerhalb der Zielsequenz amplifizieren würde. Sind keine Bindungen an andere Genabschnitte darstellbar, können die Primersequenzen im Primer Express 3.0 getestet werden.

#### **3.2.13.1.2. Primer Express 3.0**

Dieses Programm dient zur Überprüfung der Struktur der Primer. Um eine hohe Effizienz von Primern zu gewährleisten, ist es von Bedeutung, dass keine Haarnadel- oder Dimerstrukturen (Kreuzdimere, Eigendimere) vorliegen. Diese Strukturen verhindern die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte und sind somit unerwünscht.

### **3.2.13.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern eine bestimmte cDNA Sequenz amplifiziert. Dabei wird das PCR-Reaktions-Gemisch mit Hilfe eines Thermocyclers auf 96° C für 30 Sekunden erhitzt und die cDNA denaturiert. Anschließend erfolgt eine 30sekündige Inkubation bei der Primer-spezifischen Temperatur von 59° C. Dies ermöglicht eine spezifische Bindung von Primern an der passenden Sequenz der cDNA. Im Anschluß folgt eine 15minütige Inkubation bei 96° C mit einer hot start Polymerase (Hot Fire Pol), bei welcher der komplementäre DNA Strang synthetisiert wird.

Diese drei Schritte wurden 34 Mal wiederholt. Am Ende wurde die Reaktion noch einmal zehn Minuten bei der Polymerase-spezifischen Temperatur inkubiert und anschließend auf 4° C gekühlt.

#### **3.2.13.2.1. Durchführung**

7,6 µl Wasser

1,2 µl MgCl<sub>2</sub>

1,5 µl 10 x Puffer B, Solis Biodyne

1,5 µl dNTP Set 20 mM, Endkonzentration: 2 mM

1,0 µl Vorwärts-Primer (s), Endkonzentration: 20 mM

1,0 µl Rückläufiger-Primer (as), Endkonzentration: 20 mM

0,2 µl Hot Fire Pol, Endkonzentration: 1 Unit, Solis Biodyne

Aus diesen Reagenzien wurde ein Mastermix angesetzt und anschließend 1 µl der gewünschten cDNA oder 1 µl Nuclease-freies Wasser in ein Reaktionsgefäß pipettiert, welches als Negativkontrolle diente.

Die verschiedenen Ansätze wurden im Thermocycler auf die oben beschriebenen Temperaturen erhitzt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel die Spezifität analysiert.

Die Visualisierung des gewonnenen PCR-Amplifikats fand nach elektrophoretischer Auftrennung mit Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen) im Agarosegel statt.

### **3.2.13.3. Agarosegelelektrophorese**

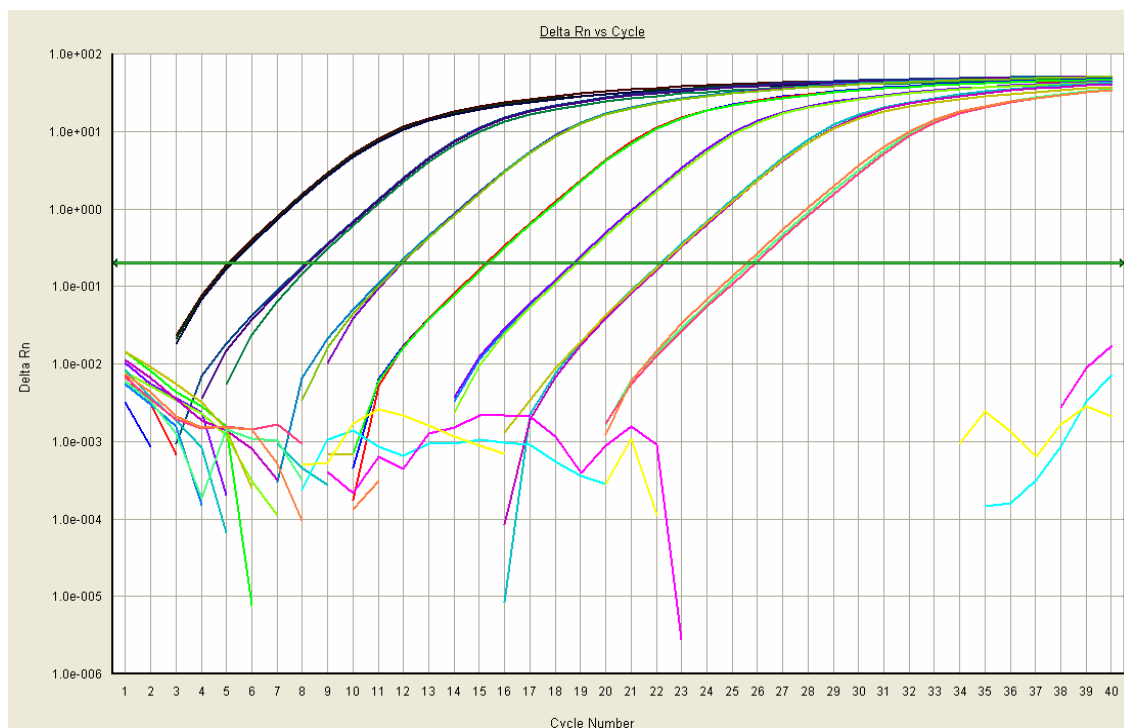
Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese konnte die Größe von DNA Fragmenten bestimmt werden, wenn diese in einer relativ großen Menge, wie sie bei der PCR entsteht, vorlagen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung wurden die Stücke der Länge nach aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung (Sigma, Deisenhofen) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße diente ein aufgetragener und gefärbter Marker (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas, Ontario, Kanada).

#### **3.2.13.3.1. Durchführung**

Die PCR-Produkte wurden in 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die erforderliche Menge peqGOLD Universal Agarose (peqLab Biotechnologie AG, Erlangen) wurde unter Aufkochen in 0,5 x TBE-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst, anschließend durch Rühren auf ca. 50° C abgekühlt und in eine Elektrophoresekammer mit Probentaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 0,5 x TBE Puffer überschichtet. 5 µl des PCR-Reaktions-Gemisches wurden mit 1 µl 6 x Loading Dye Lösung (mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF der Firma SIGMA-Aldrich, Buchs, Schweiz) gemischt und in die vorhandenen Vertiefungen des Agarosegels pipettiert. Durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe konnte die aufgetragene Lösung während der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht werden. Es wurde eine konstante Spannung (Spannungsgerät Power-Supply Power Pac 300, Bio Rad, München) von 85 Volt angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel gewandert waren. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid(10µg/ml)-Gebrauchslösung 30 Minuten unter Schwenken gefärbt. Die aufgetrennte DNA konnte durch UV-Licht (UV-Crosslinker Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) sichtbar und ihre Größe durch Vergleich mit einem Standard (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas, Ontario, Kanada) bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden in Quantity One Datenbank (Gel Doc 2000, Bio-Rad, München) dargestellt.

### 3.2.13.4. Standardkurven

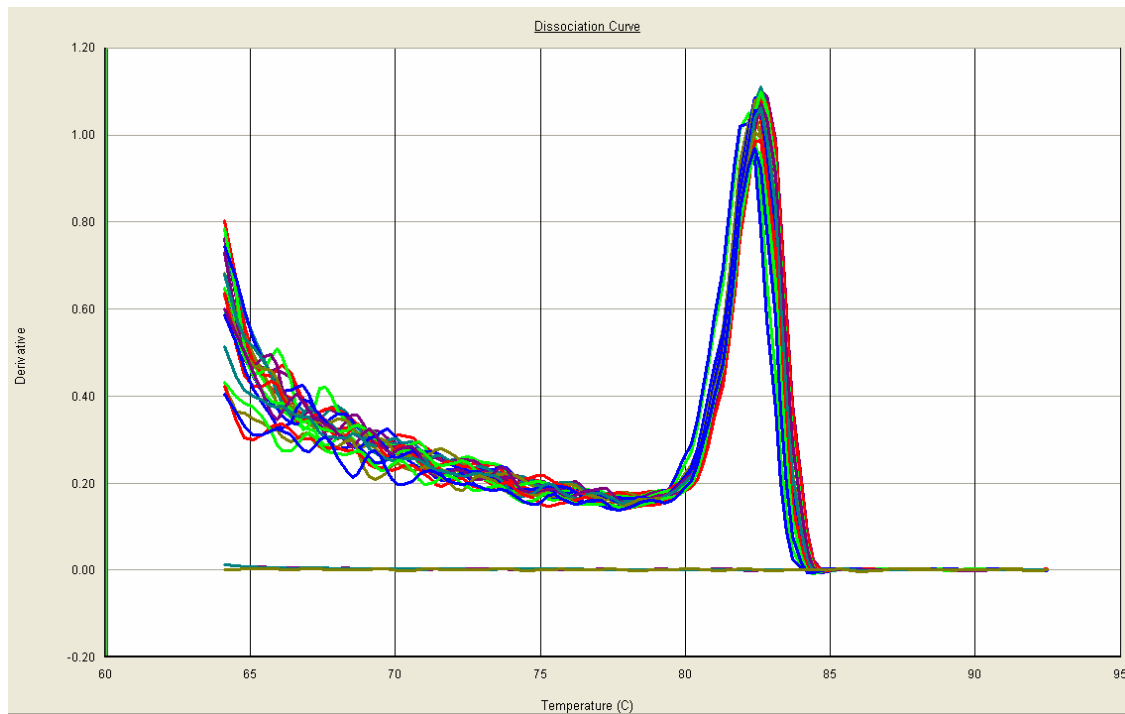
Standardkurven veranschaulichen das Verhalten von Primern bei unterschiedlichen Mengen an cDNA und ermöglichen die Ermittlung der Effizienz (vgl. Kapitel III, 3.2.14). Zur Herstellung einer Standardkurve wird eine  $\text{Log}_{10}$  Verdünnungsreihe des PCR-Produktes des jeweiligen Primers pipettiert. Die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  -  $10^{-9}$  wurden in der qPCR als Probe eingesetzt und über Amplifikationskurven dargestellt (siehe Abb. 3-4):



**Abb. 3-4: Amplifikationskurven am Beispiel einer Verdünnungsreihe**

Die einzelnen Kurven stellen die Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  dar. Je höher die Verdünnungsstufe, desto später ist der Zeitpunkt der Verdoppelung der Amplifikate und der Überschreitung des Schwellenwertes (Vergleiche Abb. 3-8).

Die Spezifität eines Primers wird zusätzlich über eine Dissoziationskurve überprüft. Hierbei kann nachgewiesen werden, ob ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde und ob eventuelle Primerdimere (Kreuzdimere, Eigendimere) oder Kontaminationen vorliegen.



**Abb. 3-5: Dissoziationskurve: Vervielfältigung eines spezifischen Amplifikates**

In der Abb. 3-5 ist eine Dissoziationskurve mit der Amplifizierung eines spezifischen Amplifikates zu sehen, die Linien im Bereich des Null-Wertes stellen Kontrollansätze ohne cDNA (No Template Kontrolle) dar. Kontrollansätze dienen zum Nachweis einer Kontamination während des Pipettiervorganges. Zusätzliche Amplifikate wären ein Hinweis auf eine Kontamination oder eine Dimerbildung.

### **3.2.13.5. Prüfung der Primer mittels Sequenzierung**

Abschließend in der Phase der Etablierung von Primern wurde die Spezifität der ausgewählten Primer mittels Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die gewünschten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von mindestens 200 ng/μl zur Sequenzierung geschickt. Die Sequenzdaten konnten drei Tage später über das Internet unter [www.my-gatc.de](http://www.my-gatc.de) eingesehen werden. Nach Erhalt der Daten wurde die Sequenz erneut im Blastverfahren getestet, um nachzuweisen, ob tatsächlich das gewünschte Gen amplifiziert wurde.

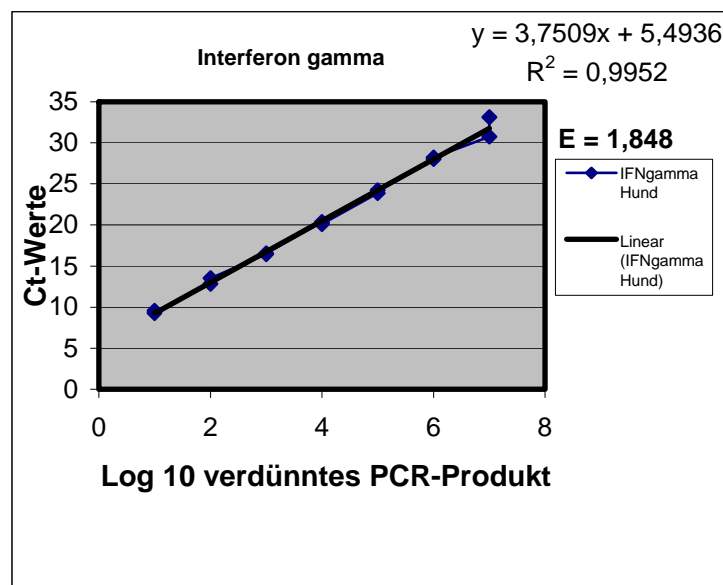


### 3.2.14. Ermittlung der Effizienzen von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , $\beta$ -Aktin und 18S rRNA

Um die Effizienzen von Primern zu bestimmen, wurde eine  $\text{Log}_{10}$ -Verdünnungsreihe eines auf einer beliebigen caninen cDNA erzeugten PCR-Produktes erstellt. Die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$  wurden in einer qPCR-Reaktion mit den jeweiligen Primern und den kommerziell zu erwerbenden Reagenzien für die Amplifizierung eingesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung der  $C_t$ -Werte. Die Effizienz wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Effizienz} = 10^{\left| \frac{1}{m} \right|}$$

Für die Beurteilung der mit verschiedenen Primer-Paaren gewonnenen Meßdaten wurden im Folgenden die Ergebnisse anhand der Korrelationsanalyse und der Regressionsgeraden dargestellt (siehe Kapitel IV, 4.1.10.2.1.).



**Abb. 3-6.1: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von Interferon- $\gamma$ . Bei der Auswertung des Effizienzvergleichs wurde das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R (Bestimmtheitsmass) und die Regressionsgerade zur Darstellung des linearen Zusammenhangs der Meßergebnisse berechnet.**

In den so entstandenen Punktwolken ist zusätzlich die Regressionsgerade eingezeichnet. Rechts neben der Abbildung ist jeweils das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten ( $R^2 = \text{Bestimmtheitsmass}$ ) und die Regressionsgeradengleichung ( $y = mx + b$ ) angegeben.

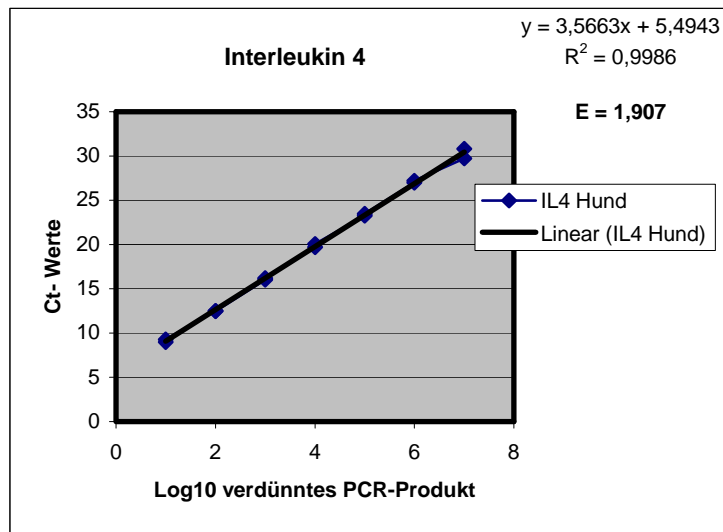


Abb. 3-6.2: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von IL-4

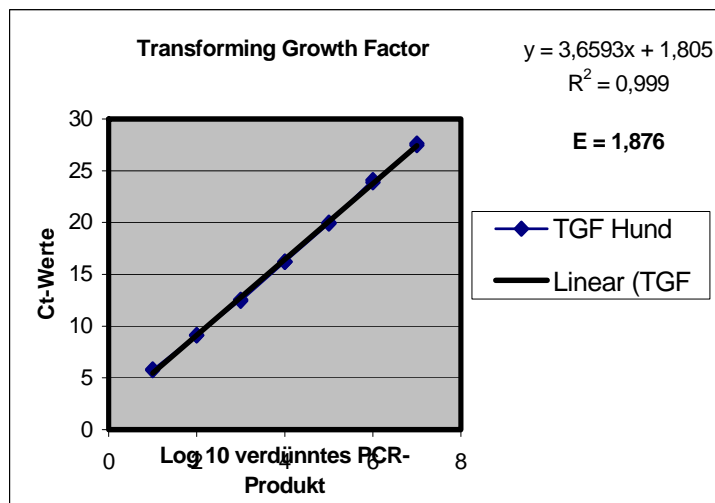
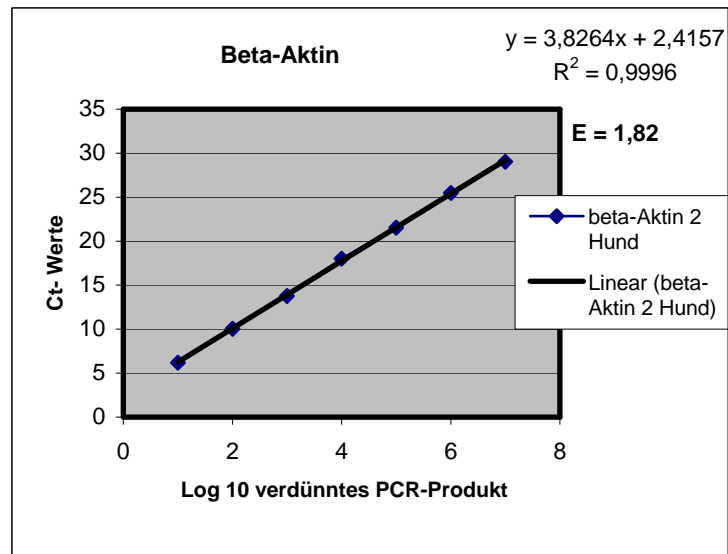
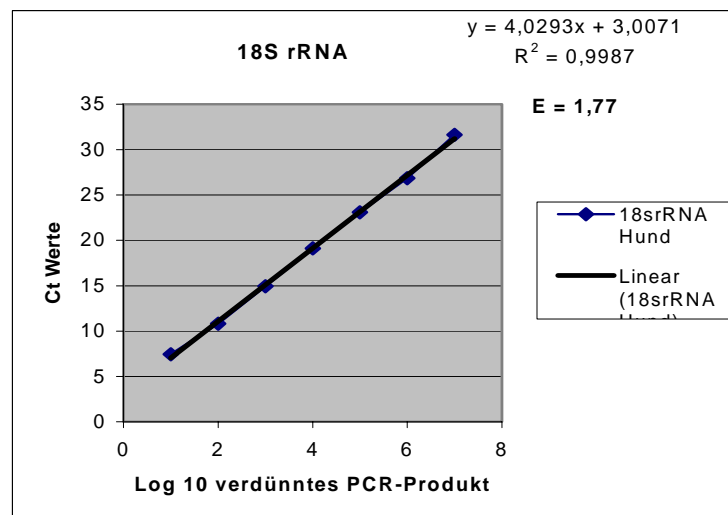


Abb. 3-6.3: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von TGF-β



**Abb. 3-6.4: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von  $\beta$ -Aktin**

Bei einem PCR-System, bei welchem mit Halbierung der eingesetzten log ng Gesamt-RNA- bzw. cDNA-Menge die Zyklenzahl um einen Zyklus steigt, würden die Wertepaare auf einer Geraden liegen. Die Steigung würde 3,3 betragen und der Korrelationskoeffizient  $R^2$  würde 1 sein.



**Abb. 3-6.1-5: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von 18s rRNA**

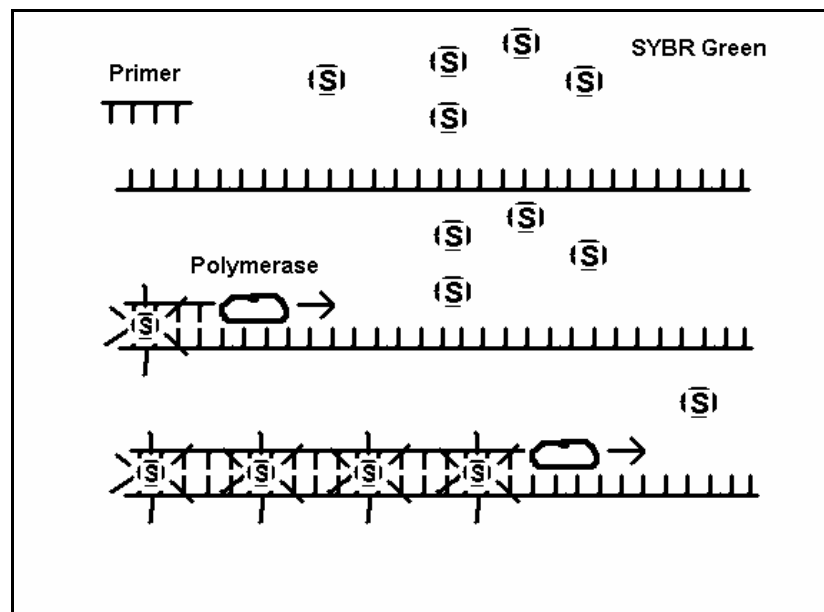
### **3.2.15. Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese**

Die mittels RNA-Präparation (Trifast<sup>TM</sup>-Methode) aus Hundeblood gewonnene RNA wurde elektrophoretisch in Agarosegel (2 %; peqLab Biotechnologie AG, Erlangen) aufgetrennt. Die Ergebnisse in Abb. 4-6 zeigen, dass sich bei der extrahierten RNA 28s- und 18s ribosomale RNA deutlich nachweisen ließen.

### **3.2.16. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)**

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion wird in der Literatur mit verschiedensten Abkürzungen bezeichnet (qPCR, Real Time PCR, RT-PCR) und ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Diese Vervielfältigungsmethode beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion (PCR) und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während und am Ende eines PCR-Zyklus durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht erforderlich, da die Daten sofort verfügbar sind.

Als Fluoreszenzfarbstoff fand der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green (Qiagen, Hilden) Verwendung, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich durch Anlagerung an doppelsträngige DNA verbessern (siehe Abb. 3-7). Der Vorteil bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen ist, dass nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden kann, anhand derer die Fragmentlänge(n) und dadurch die Spezifität bestimmt werden können.



**Abb. 3-7: Wirkung eines interkalierenden Farbstoffs am Beispiel von SYBR Green**

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur kontinuierlich von 57° C auf 95° C erhöht und die DNA aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich.

Die in diesem Versuch verwendete „Real Time SYBR-Green-PCR“ diente zur Quantifizierung von IL-4-, IFN- $\gamma$ -, TGF- $\beta$ -,  $\beta$ -Aktin- und 18S rRNA-cDNA-Kopien. Während eines PCR-Laufs wird die Ausgangsmenge der Zytokin-cDNA in der Gesamt-cDNA der Blutproben bestimmt. Hierfür wurde das ABI PRISM<sup>TM</sup> 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt.

Für jede Probe wurde für die Zytokine und das gewählte Housekeeping-Gen (18S rRNA oder  $\beta$ -Aktin) jeweils eine Dreifachbestimmung (Triplikate) durchgeführt. Um Verunreinigungen ausschließen zu können, wurde zusätzlich ein Dreifachansatz mit einer No-Template-Kontrolle (NTC) anstelle der cDNA-Probe untersucht.

Zunächst wurden die jeweiligen Gesamtansätze ohne Zugabe der cDNA durch Pipettieren folgender Komponenten hergestellt:

**1x Ansatz**

Vorwärtsprimer (10 $\mu$ M)	4,95 $\mu$ l
Rückläufiger Primer (10 $\mu$ M)	4,95 $\mu$ l
SYBR Green	41,25 $\mu$ l
<u>Nuklease freies Wasser</u>	<u>28,05 <math>\mu</math>l</u>
Gesamt	79,2 $\mu$ l
cDNA*	

\*cDNA wurde nach Aufteilen in die einzelnen 0,5ml-Eppendorfgefäße in einer Menge von 3,3  $\mu$ l hinzugefügt. In die Kontrollen (NTCs) wurde anstatt cDNA 3,3  $\mu$ l RNase freies Wasser pipettiert.

Das Volumen des Ansatzes errechnet sich nach der zu untersuchenden Probenzahl x 3 (Dreifachansatz) + 10 % (Volumenverlust durch mehrere Pipettierschritte).

Im Anschluss wurde die Gesamtmenge entsprechend der Anzahl der Proben als Dreifachansätze aliquotiert und schließlich jeweils die entsprechende cDNA-Probe (3,3 $\mu$ l) bzw. Wasser (3,3 $\mu$ l) als Kontrolle zugegeben.

Von jedem Dreifachansatz wurden jeweils 25  $\mu$ l in drei Reaktionsgefäße einer MicroAmp® Optical 96-Loch-Reaktionplatte pipettiert und die Platte mit einer optischen Folie verschlossen.

**3.2.16.1. Durchführung**

Die „Real Time SYBR Green“-PCR im 7300 Sequence Detection System fand unter folgenden Bedingungen statt:

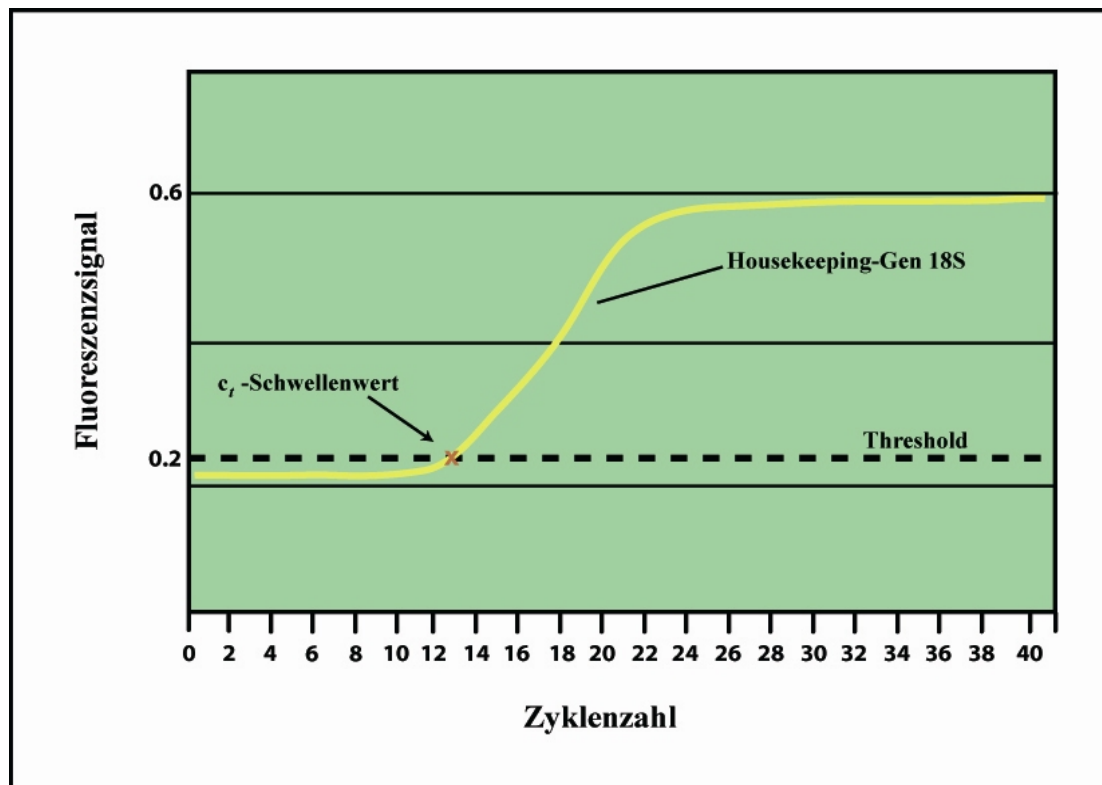
Die verschiedenen Ansätze wurden im qPCR-Gerät nach einem primären Erhitzungsschritt zur Aktivierung der Polymerase (95° C, 15 Minuten) auf die Primer-spezifische Annealing-Temperatur (59° C) erhitzt. Die beschriebenen Temperaturen wurden automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsprüfung des qPCR Produktes angefertigt.

Folgende Temperaturzyklen wurden während eines Amplifikationszykluses und anschließender Dissoziationskurve durchschritten:

1. Aktivierung der DNA-Polymerase: 95° C, 15 min
2. 45 Zyklen: Denaturierung: 94° C, 15 sec  
Annealing/Extension: 59° C, 30 sec  
Quantitative Messung: 72° C, 30 sec
5. Dissoziationskurve: 95° C, 15 sec  
57° C, 15 sec  
95° C, 15 sec

### 3.2.16.2. Auswertung

Während einer qPCR wird eine Hintergrund-, Exponential-, Linear- und Plateauphase durchschritten. In der Hintergrundphase einer qPCR ist die cDNA-Menge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich cDNA, Primer und Polymerase treffen, noch relativ gering ausgeprägt. Ab einem bestimmten Schwellenwert ("Schwellenwert-Zyklus" = Threshold Cycle) steigt die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz an. Dieser Schwellenwert wird als  $C_t$ -Wert bezeichnet und ist im Anfangsbereich der Exponentialphase lokalisiert (siehe Abb. 3-8). In der Linearphase steigt die Menge der Produkte derart an, dass es im späteren Verlauf zur Hemmung durch eigens synthetisierte Produkte führt. Hierbei hybridisieren häufiger Produktfragmente miteinander, die Substrate werden langsam verbraucht und Polymerasen werden durch die Temperatur denaturiert (Plateauphase).



**Abb. 3-8:** Der  $C_t$ -Wert beschreibt den Zeitpunkt einer Messung, bei welchem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt

Mit Hilfe der  $C_t$ -Werte konnte eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Hierfür wurden die Werte der zu untersuchenden Proben auf die Werte einer internen Kontroll-RNA bezogen, um Unterschiede in der eingesetzten RNA-Menge auszugleichen. Dieses Verfahren wird als Normalisierung bezeichnet. Da die Gesamtanalyse auf diesem Signal beruht, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Versuches.

Nach Normalisierung des  $C_t$ -Wertes der Probe wurde dieser Wert ( $\Delta C_t$ ) mit dem  $\Delta C_t$ -Wert einer unbehandelten Kontrolle verrechnet ( $\Delta\Delta C_t$ ). Der resultierende  $\Delta\Delta C_t$ -Wert einer Probe gibt somit Auskunft über die normalisierte Differenz in der Zykluszahl zweier Proben beim Erreichen des Schwellenwertes. Zur Veranschaulichung wurden Ergebnisse auch als ein ‚Vielfaches des Expressionslevels‘ in der unbehandelten Kontrolle angegeben. Hierfür wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$\text{n-fache Expression (Probe zu unbehandelte Kontrolle)} = \text{Effizienz}^{-\Delta\Delta C_t}$$



## IV. Ergebnisse

### 4.1.1. Blutentnahme an der Vena jugularis

#### 4.1.1.1. Vorversuch Blutentnahme

##### 4.1.1.1.1. Optimierung der Leukozyten-Gewinnung aus Hundeblood

Zu Versuchsbeginn sah der Versuchsaufbau vor, Proliferations- und Stimulationsversuche aus Blut ein und desselben Hundes zu bearbeiten. Da selbst bei Volumina von 60 ml Blut nur bei ca. 50 % der Patienten die erforderliche Menge an PBLs isoliert werden konnte, wurden die Proliferations- und Stimulationsversuche aus unterschiedlichen Blutproben durchgeführt.

##### 4.1.1.1.2. Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen in Blutproben

In einem Vorversuch wurden optimale Bedingungen für die Blutprobenentnahme ausgetestet. Die Bedeutung lag in der Gewinnung maximaler Leukozytenkonzentrationen aus den jeweiligen Blutproben. Der Leukozytengehalt zweier Blutproben wurde im Vergleich ausgewertet. Als Probandin diente eine achtjährige gesunde Podenco-Mischlings-Hündin. Die Blutproben wurden im Abstand von vier Wochen entnommen, die Hündin war zu beiden Blutabnahmetermen von der klinischen Allgemeinuntersuchung unauffällig. Vor der ersten Blutentnahme hatte die Hündin zwei Stunden geschlafen und wurde zur Blutabnahme aufgeweckt. Vor der zweiten Blutabnahme spielte sie für zehn Minuten sehr ausdauernd.

**Tab. 4-1: Vergleich Leukozytenkonzentrationen einer achtjährigen gesunden Podenco-Mischlings-Hündin:**

Gesunde Hündin	Blutprobenentnahme nach Ruhephase der Hündin	Blutprobenentnahme nach zehnminütigem Spielen
Leukozytengehalt	$1,8 \times 10^8$ Zellen/10 ml	$4,34 \times 10^8$ Zellen/10 ml

Die Resultate veranschaulichen, dass durch Bewegung Leukozyten vom marginalen Pool in den zentralen Blutstrom geleitet und höhere Konzentration von Leukozyten in der Blutprobe erreicht werden können. Die Hunde aus der Studie wurden vor der Blutprobenentnahme

durch Bewegung, Spiel oder Animation in Aufregung gebracht, um somit maximale Konzentrationen von Leukozyten in der Blutprobe zu erreichen.

#### 4.1.2. Ermittlung der Zellzahl

Nach Isolation der PBLs konnte mit Hilfe einer Berechnung (Anzahl der Zellen:ausgezählte Fläche (mm<sup>2</sup>) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung) die Zellzahl ermittelt werden.

**Tab. 4-2: PBL-Gehalt nach Präparation PBLs**

Atopiker/Gesunde	Isolierte Zellen ( x 10 <sup>8</sup> Zellen/10ml)	Versuch	eingesetzte Zellzahl
A1	3,90	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A2	2,82	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A3	2,43	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A4	3,95	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A5	3,97	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A6	4,36	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A7	7,58	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A8	1,46	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A9	2,99	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A10	1,84	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A11	2,00	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
A12	2,70	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A13	2,90	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A14	2,04	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A15	3,20	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A16	5,00	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A17	4,20	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A18	2,60	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A19	3,00	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A20	3,20	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
A21	2,80	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N1	1,40	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N2	1,40	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N3	6,60	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N4	2,00	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N5	3,30	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N6	4,00	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N7	3,10	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N8	3,00	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N9	3,11	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N10	2,00	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N11	2,80	Proliferationsversuch	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
N12	2,08	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N13	2,59	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml

Atopiker/Gesunde	Isolierte Zellen ( x 10 <sup>8</sup> Zellen/10ml)	Versuch	eingesetzte Zellzahl
N14	2,54	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N15	2,20	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N16	1,56	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N17	3,31	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N18	2,86	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N19	1,90	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N20	2,54	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml
N21	2,90	Stimulationsversuch	2 x 10 <sup>7</sup> Zellen/ml

### 4.1.3. Proliferationsversuch

#### 4.1.3.1. Vorversuche Proliferation

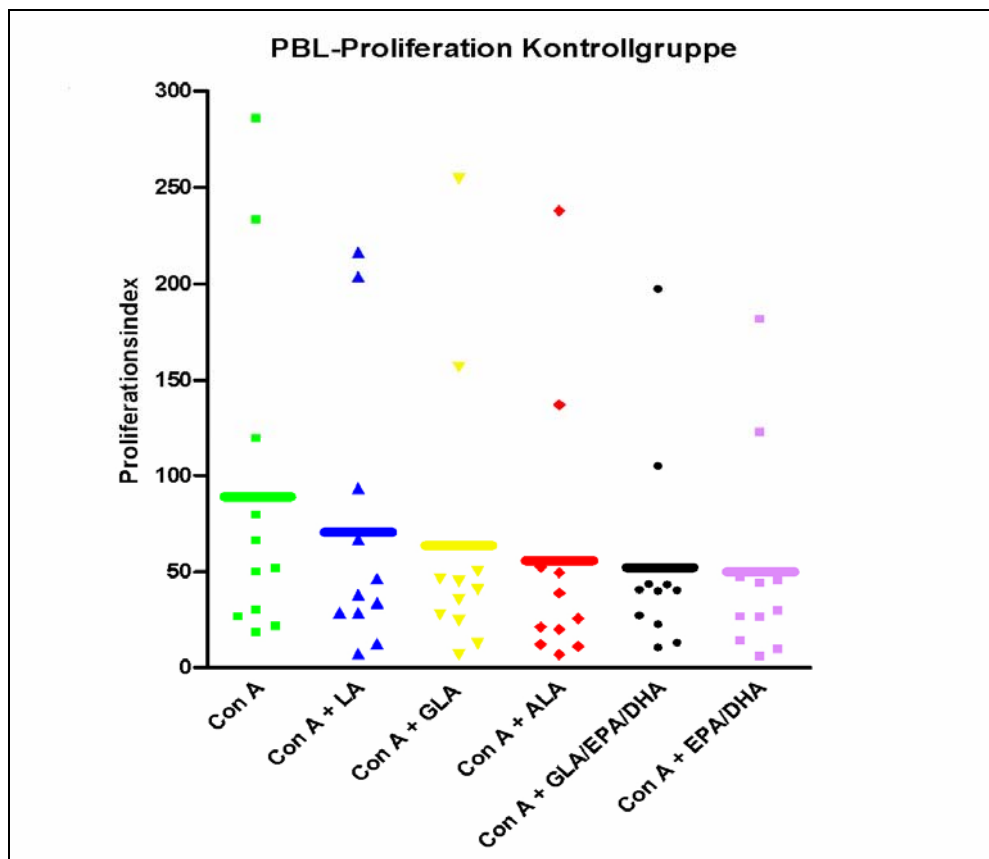
##### 4.1.3.1.1. Resultate der Vorversuche

Bevor in den Hauptversuchen die Proben standardisiert bearbeitet werden konnten, mussten verschiedene Verarbeitungsschritte etabliert werden. Hierzu musste eine geeignete Positivkontrolle, Fettsäuren- und Allergenkonzentration getestet werden (vgl. Kapitel III, 3.2.4.1.1-3).

Die höchsten Proliferationen konnten mit Con A als Positivkontrolle ermittelt werden. In den folgenden Versuchen wurde Con A als Positivkontrolle eingesetzt. Die höchste Inhibierung der Proliferation konnte mit einer Fettsäurenkonzentration von 10<sup>-5</sup> M erzielt werden. In nachfolgenden Proliferations- und Stimulationsversuchen wurden Fettsäuren in dieser Konzentration verwendet. Die deutlichste Inhibierung der Proliferation in Anwesenheit von Allergen (*D.farinae*) konnte bei einer Konzentration von 50 µl Allergen (40.000 PNU/ml)/ml Zellsuspension nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde in den Hauptversuchen 50 µl Allergen/ml Zellsuspension in den Stimulationsversuchen standardmäßig zugegeben.

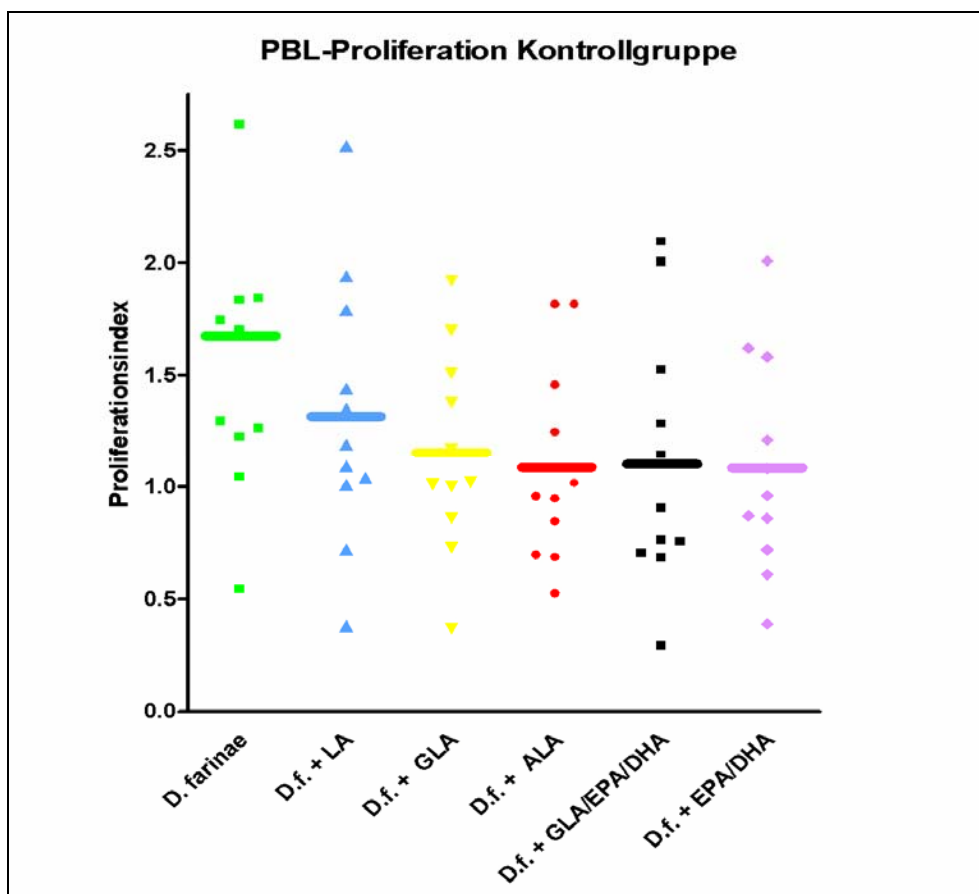
#### 4.1.3.2. Resultate Proliferationsversuch

Gesunde Hunde zeigten bei Anwesenheit von Concanavalin A eine graduelle Reduktion der Proliferationsindices bei einer Inkubation der peripheren Blutleukozyten mit LA, GLA, ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA. Der Proliferationsindex war im Vergleich zur Negativkontrolle statistisch signifikant bei ALA, EPA/DHA ( $P < 0.05$ ) und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.05$ ).



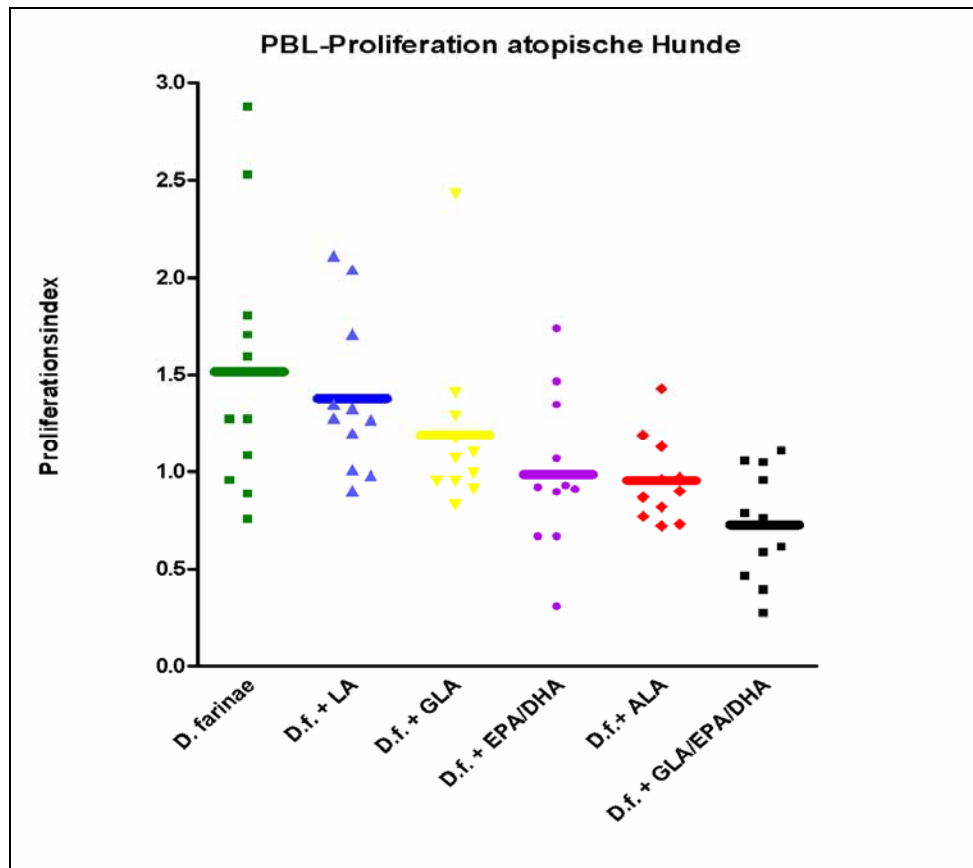
**Abb. 4-1: Inhibierung der PBL-Proliferation gesunder Hunde nach Inkubation mit Con A und verschiedenen Fettsäuren. Diese Inhibierung war statistisch signifikant zwischen der Negativkontrolle (nur Con A) und der Inkubation mit Con A und ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.05$ ).**

Eine ähnliche Reduktion der PBL-Proliferation konnte bei gesunden Hunden bei Anwesenheit von Allergenen gesehen werden. Alle Fettsäuren mit Ausnahme der LA ( $P < 0.05$ ) lösten eine statistisch signifikante Inhibierung der Proliferation aus (GLA, ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA,  $P < 0.001$ ).



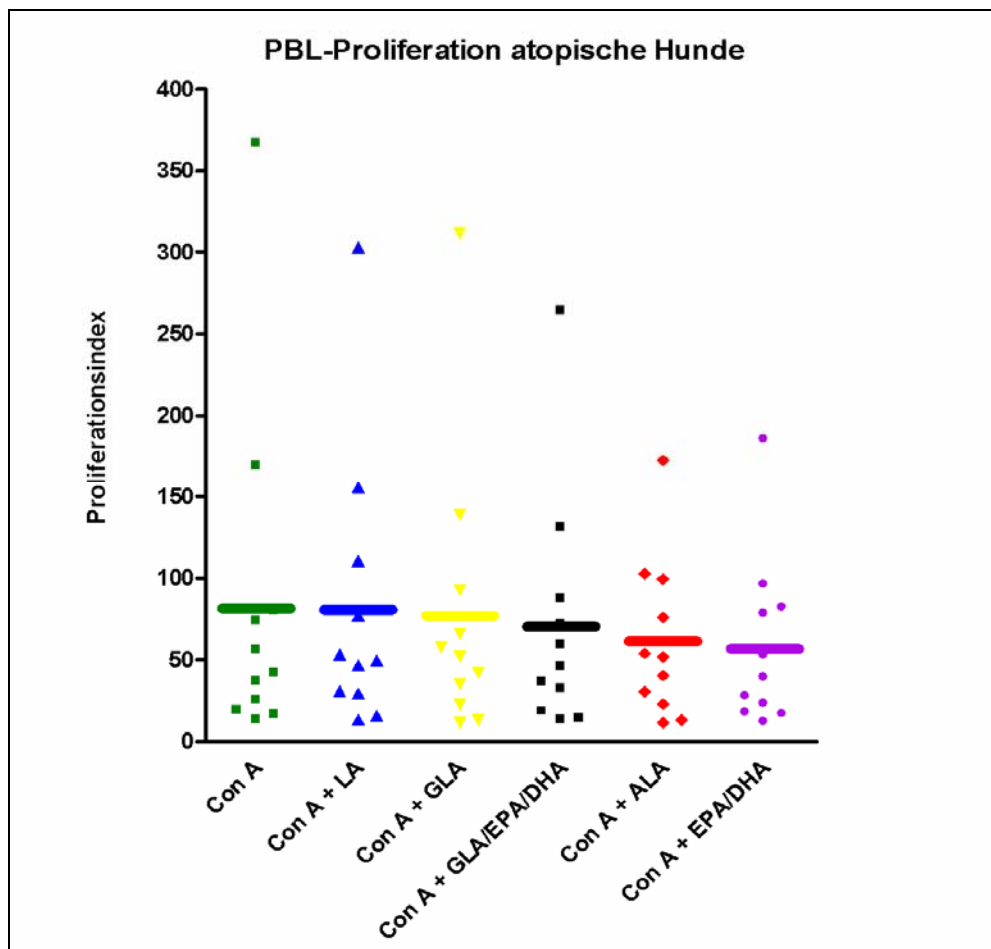
**Abb. 4-2: Inhibierung der PBL-Proliferation gesunder Hunde nach Inkubation mit Allergen (*D.farinae*) und verschiedenen Fettsäuren. Alle Fettsäuren mit Ausnahme der LA ( $P < 0.05$ ) lösten eine statistisch signifikante Inhibierung der Proliferation aus (GLA, ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA,  $P < 0.001$ ).**

Im Vergleich konnte bei allergischen Hunden eine ähnliche Reduktion nur in der Anwesenheit von Allergenen ausgelöst werden. Diese Reduktion war statistisch signifikant nach einer Inkubation mit ALA ( $P < 0.001$ ), EPA/DHA ( $P < 0.01$ ) und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.01$ ).



**Abb. 4-3: Inhibierung der PBL-Proliferation atopischer Hunde nach Inkubation mit Allergen (*D.farinae*) und verschiedenen Fettsäuren. Diese Reduktion war statistisch signifikant nach einer Inkubation mit ALA ( $P < 0.001$ ), EPA/DHA ( $P < 0.01$ ) und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.01$ ).**

Durch die Zugabe von Concanavalin A zu den verschiedenen Fettsäuren konnten bei atopischen Hunden keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.



**Abb. 4-4: Inhibierung der PBL-Proliferation atopischer Hunde nach Inkubation mit Concanavalin A und verschiedenen Fettsäuren. Die Abbildung verdeutlicht, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Proliferation gab**

#### 4.1.4. Kultivierung von Zellen für Stimulationsversuch

##### 4.1.4.1. Vorversuche Stimulation

##### 4.1.4.1.1. Bestimmung der erforderlichen Zellkonzentration

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, in welcher Konzentration Zellen kultiviert werden müssen, um bei RNA-Präparationen eine ausreichende Konzentration von 0,4 µg RNA zu erhalten. Es wurden Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml ( $1,5 \times 10^7$  Zellen/3ml) in 6-Loch-Platten eingesät und 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Vergleich wurden aufgetaute Zellen in einer Konzentration von  $8 \times 10^6$  Zellen/ml, frisch präparierte Zellen in Konzentrationen von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml und  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingesetzt.

**Tab. 4-3: Vergleich aufgetaute PBLs/frisch präparierte PBLs zum Zeitpunkt des Einsäens in das Kulturmedium und nach 72 Stunden Inkubation**

Probe	Ausgangsbedingungen	Eingesetzte PBL-Konzentration	Lebende PBLs nach 72 Stunden Inkubation (37° C, 5 % CO <sub>2</sub> ):
1	aufgetaute PBLs	$8 \times 10^6$ Zellen/ml	$1 \times 10^6$ Zellen/ml
2	Frisch präparierte PBLs	$5 \times 10^6$ Zellen/ml	$5 \times 10^5$ Zellen/ml
3	Frisch präparierte PBLs	$1 \times 10^7$ Zellen/ml	$2,1 \times 10^6$ Zellen/ml
4	Frisch präparierte PBLs	$2 \times 10^7$ Zellen/ml	$3,6 \times 10^6$ Zellen/ml

Nach 72 Stunden Inkubation konnten durchschnittlich nur noch 1/5-1/8 der Zellen in einer Lebend/Totfärbung mit Trypanblau mikroskopisch als lebend beurteilt werden.

Die photometrische Messung erbrachte folgende RNA-Gehalte (RNA 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt):



**Tab. 4-4: photometrische Messung RNA-Gehalt im Vergleich aufgetaute PBLs/frisch präparierte PBLs nach 72 Stunden Inkubation**

Probe	Photometrische Messung RNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) 1:50 verdünnt	Absorptionsspektrum ( $A_{260}/A_{280\text{nm}}$ )	RNA-Gehalt ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1	3,8	1,66	0,076
2	0,2	2,4	0,004
3	0,2	1,95	0,004
4	3,5	1,95	0,07

Dieser Vorversuch veranschaulichte, dass PBLs eine Inkubation von 72 Stunden zu einem großen Teil nicht überleben. Zusätzlich ist in der Literatur von hohen Zytokinexpressionen bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden beschrieben. Stordeur *et al.* (2003) injizierten fünf Probanden Lipopolysaccharid (LPS), um anschließend die mRNA-Menge von IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  im Blut mittels „Real Time“-PCR zu bestimmen. Dabei konnte bei den einzelnen Probanden bereits nach 30 Minuten bis sechs Stunden nach Injektion eine bis zu 47fache bzw. 22fache Zunahme der Kopienzahl nachgewiesen werden (Stordeur et al., 2003). In weiteren Vorversuchen wurde die optimale Stimulationszeit/Inkubationszeit ermittelt (siehe unten) und in den Hauptversuchen standardmäßig durchgeführt.

#### 4.1.4.1.2. Inkubation der PBLs über 6, 10 und 18 Stunden

**Tab. 4-5: Veränderung der Expressionswerte von  $\beta$ -Aktin, IFN- $\gamma$ , IL-4 und TGF- $\beta$  nach 6 Stunden-, 10 Stunden- und 18 Stunden Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>**

$-\Delta\Delta\text{Ct}$	n-fache Zunahme der Expression nach 6 h	n-fache Zunahme der Expression nach 10 h	n-fache Zunahme der Expression nach 18 h
$\beta$ -Aktin	0,8	0,92	2,19
IFN- $\gamma$	11,95	-1,02	5,9
IL-4	10,95	-0,3	8,48
TGF- $\beta$	1,61	-0,39	-0,91

Die Resultate veranschaulichen, daß die Expression der Zytokine bei einer sechsständigen Inkubation die höchsten Werte erzielte. In den Hauptversuchen wurden die PBLs auf Grund dessen über sechs Stunden inkubiert.

#### **4.1.5. Bioanalyzer**

In dieser Studie konnten bei allen 100 Proben (20 Patienten mit jeweils 5 Proben) eine RIN > 7,5 gemessen werden. 90 % der Proben erbrachten eine optimale RIN von 9,0-10,0. RNA von guter Qualität und hoher RNA Integritätsnummer (RIN von 7,5-10) wurde in anschließenden Verarbeitungsschritten in eine cDNA umgeschrieben.

#### **4.1.6. Konzentrationsbestimmung von RNA**

Die Konzentration der gelösten RNA wurde durch photometrische Messung im BioPhotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dabei erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen ein Lösungsmittel (Leerwert für RNA). Zur Messung des Leerwertes wurden 100 µl Aqua bidest. eingesetzt. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Aufschluss über eine Verunreinigung der Nukleinsäure durch Proteine. Reine RNA sollte einen Wert von ca. 2,0 zeigen.

#### **4.1.7. QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transkription**

Zur Transkription der RNA in cDNA wurden 0,4 µg mRNA abhängig von der photometrischen RNA-Messung entsprechend ihrer Konzentration mit bis zu 12 µl RNase freiem Wasser verdünnt.

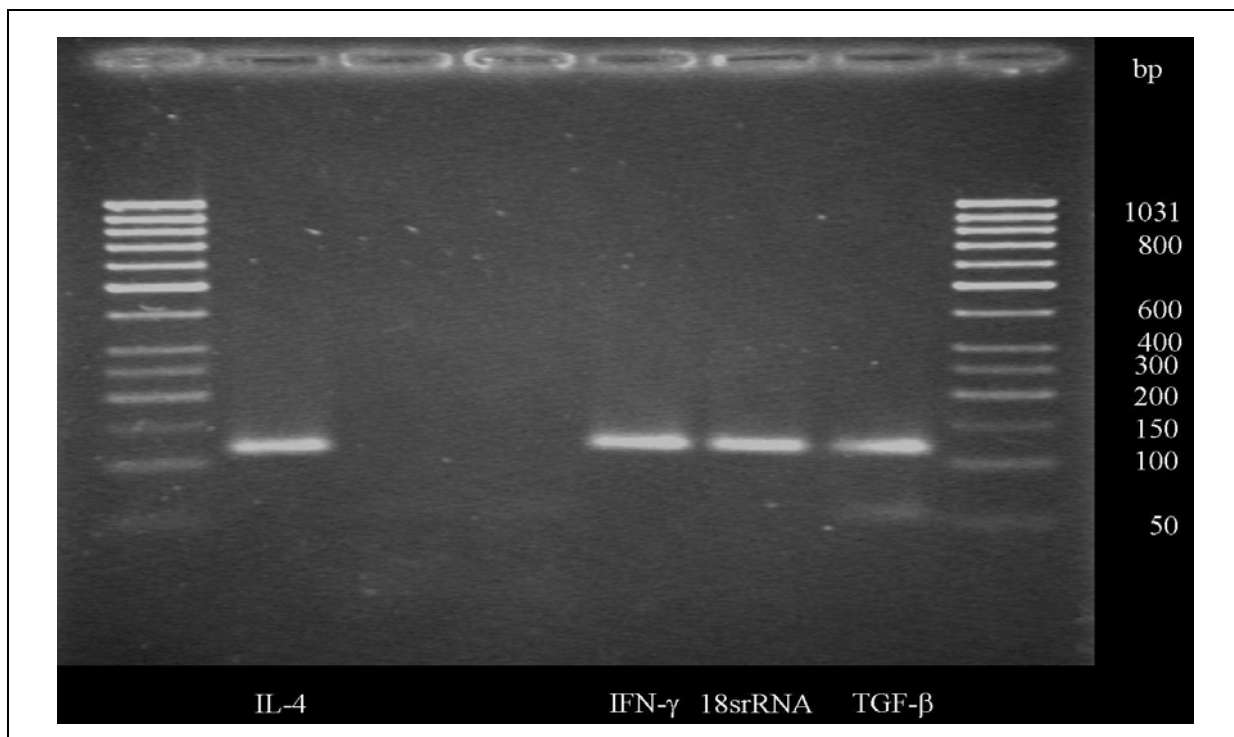
Die optische Dichte (OD) Messung am Photometer ermöglichte eine Berechnung der einzusetzenden RNA-Menge. Die errechneten Konzentrationen sind im Anhang 9.6 aufgeführt.

#### 4.1.8. Etablierung der Primer

##### 4.1.8.1. Prüfung der Primer mittels PCR und Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob das IL-4-, IFN- $\gamma$ -, TGF- $\beta$ -,  $\beta$ -Aktin- und das 18S-Amplifikat mit den ausgewählten Primern amplifiziert werden können, wurden in einer PCR die Annealing-Temperatur von 59° C gewählt und die PCR-Produkte auf Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

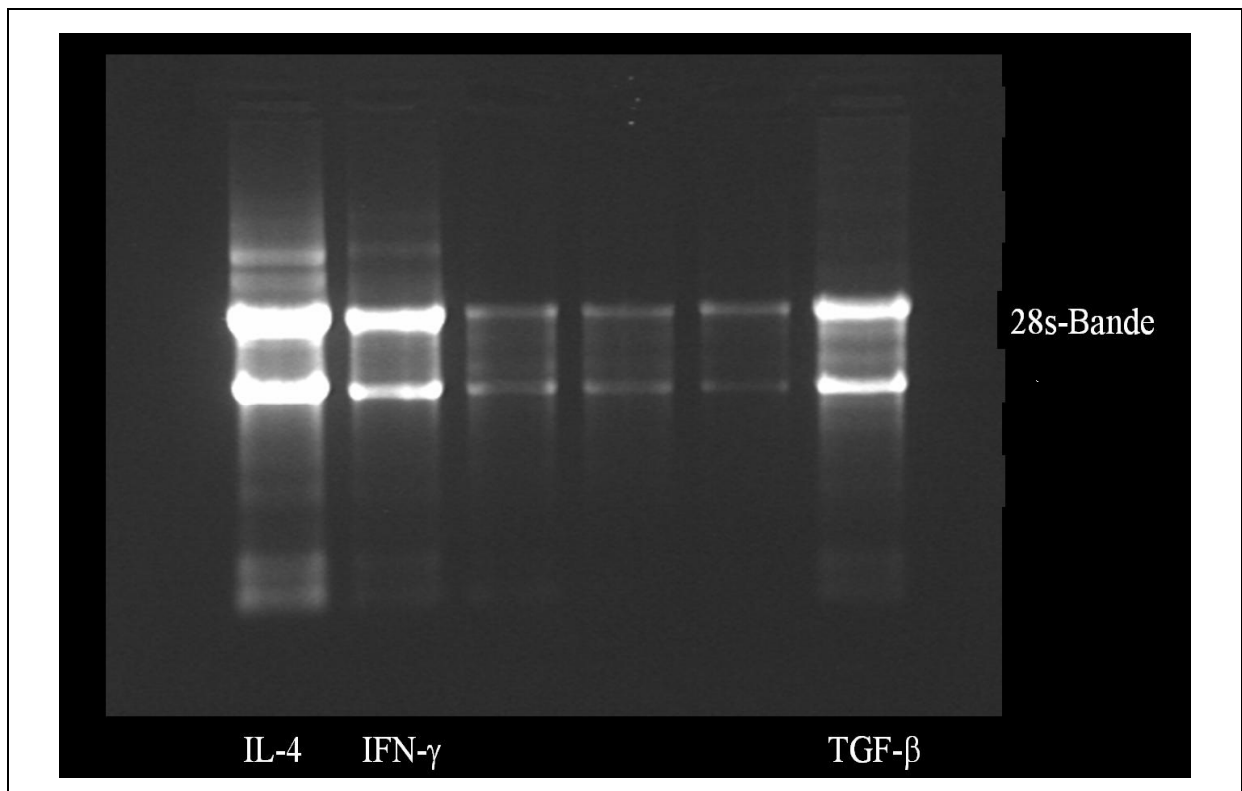
Die Ergebnisse zeigten, dass die jeweiligen Amplifikate ohne Dimere/Kontaminationen nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb.4-5).



**Abb. 4-5: Einzelne Banden mit einer Basenpaarlänge von 100-150 bp deuten auf spezifische Amplifikate von IL-4, IFN- $\gamma$ , und 18S rRNA (Beschriftung von links nach rechts) hin. Darstellung des 50bp-Markers im linken und rechten Bildbereich. Bei TGF- $\beta$  (rechts) ist ein zweites Amplifikat mit einer Länge von 50 Basenpaaren sichtbar**

#### 4.1.9. Kontrolle der RNA durch Gelelektrophorese

Die mittels RNA-Präparation (Trifast<sup>TM</sup>-Methode) aus Hundeblut gewonnene RNA wurde elektrophoretisch in Agarosegel (2 %; peqLab Biotechnologie AG, Erlangen) aufgetrennt. Die Ergebnisse in Abb. 4-6 zeigen, dass sich bei der extrahierten RNA 28s- und 18s ribosomale RNA deutlich nachweisen ließen.



**Abb. 4-6: Agarosegelelektrophorese mit RNA. Die dargestellten Banden sind im Bereich von 18s und 28s ausgebildet**

#### **4.1.10. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)**

##### **4.1.10.1. Statistik**

Die statistische Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten erfolgte auf einem Personalcomputer mit den Programmen Microsoft Excel, Version Office XP 2001, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint und PrismGraph, Version Graphpad Prism 4.0 und InStat Software, Version 3.06, Graphpad Software, San Diego, USA.

##### **4.1.10.1.1. Dunn's Test**

Der Vergleich von Zytokinexpressionen (vgl. Kapitel IV, 4.1.13.) zwischen Atopikern und der Kontrollgruppe wurde unter Zuhilfenahme des Friedman Testes kombiniert mit Dunn's Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Die unterschiedlichen Signifikanzen werden in Tabellen in Kapitel IV, Tab. 4-6 – 4-12 aufgeführt. Für den Vergleich der Zytokinexpressionen zwischen gesunden und atopischen Hunden wurde der Kruskal Wallis Test mit Dunn's Post Test eingesetzt.

##### **4.1.10.2. Ermittlung der Effizienzen von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , $\beta$ -Aktin und 18S rRNA**

Um die Effizienzen von Primern zu bestimmen, wurde eine Log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe eines auf einer beliebigen caninen cDNA erzeugten PCR-Produktes erstellt. Die Verdünnungsstufen 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-9</sup> wurden in einer qPCR-Reaktion mit den jeweiligen Primern und den kommerziell zu erwerbenden Reagenzien für die Amplifizierung eingesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung der C<sub>t</sub>-Werte. Die Effizienzen sind in Kapitel IV, Tab. 4-6 aufgeführt.

#### 4.1.10.2.1. Korrelations- und Regressionsanalyse

Bei der Auswertung des Effizienzvergleichs wurde das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R (Bestimmtheitsmass) und die Regressionsgerade zur Darstellung des linearen Zusammenhangs der Meßergebnisse berechnet. In den Diagrammen wurden die Meßwertpaare (x/y) als Punktwolken und die Regressionsgerade mit der Gleichung

$$y = mx + b$$

m = Steigung,

b =y-Achsenabschnitt

abgebildet. Bei einer vollkommenen Übereinstimmung der Meßwertpaare mit der Regressionsgeraden entspricht  $R^2 = 1$ .

#### 4.1.10.3. Primer der quantitativen Polymerase Kettenreaktion

Folgende Primer wurden im Rahmen dieser Studie etabliert. Von IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , 18S rRNA und  $\beta$ -Aktin wurden die Expressionen standardmäßig in den Hauptversuchen gemessen.

**Tab. 4-6: Auflistung der verwendeten Primer**

Spezifisch für Gen	Oligo-Primer Nummerierung	Sequenz	Sequenzierung des PCR-Produktes	Basenpaarlänge (bp)	Effizienz	Annealing Temperatur
18S rRNA	987	TCGGAACT GAGGC- CATGATT	gggtgggacgggg ctgnttgcgcccgtg aggtaattcttg- gaccggc	100	1,770	59° C
	988	TTTCGCTC TGGTCCGT CTTG				59° C
IL-4	1152	GCACT- CACCAG- CACCTTTG TC	atcaTCAA- AatgtTGAA- CATCCTCA- CAGCGAGA- AACG	91	1,907	59° C
	1153	CGTTTCTC GCTGTGAG GATGT				59° C
IFN- $\gamma$	1156	GCTTTGCG TGATTTTG TGTTCTT	Gaaatagaa- aaCCTAAAG- GAATATTT- TAATGCAAG- TAATCCA- GATGTATCG- GACGGtg	113	1,848	59° C
	1157	CACCGTCC GATA- CATCTG- GATTA				59° C

Spezifisch für Gen	Oligo-Primer Nummerierung	Sequenz	Sequenzierung des PCR-Produktes	Basenpaarlänge (bp)	Effizienz	Annealing Temperatur
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	1158	GTA- TATGGCCC CCGAAGTT CTAG	cGtgCCGA- CATCTATG- caATGGGCT- TAG- TATTCTGGGa	98	1,876	59° C
	1159	CCCAGAA- TAC- TAAGCC- CATTGC				59° C
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	1163	A- TACCGCCT ATTC-	CAGGGTtgnGA AGGTCC- GAGCCTTAG- GACC- CACTTTCCTG TCTTACC- CAATGTTTTTC CTGCCAGAA- CACCGTGGGT GGTTAATTGC CTTGAAGTTG Ga	174	1,820	59° C
	1164	TTCCA ACT TCAAGG- CAAT- TAACC				59° C
<b>IL-10</b>	1150	CCAC- GACCCA- GACAT- CAAGA	TcaaGanCCT- caGGCT- GAGgcTGC- GACGCTGT- CACC- GATTTCTgCC CTGTGAGAA- TAAGAG- CAAGGCGGTG GAa	126	1,86	59° C
	1162	TCCACCGC CTTGCTCTT ATT				59° C
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	985	TCTCGAAC CCCAAGT- GACAAG	nicht ermittelt (siehe Kapitel V, 5.4)	nicht ermit- telt	nicht ermittelt	59° C
	986	CAACC- CATCT- GACGG- CACTA				59° C



#### 4.1.11. Allgemeine Erklärung zur Bestimmung einer relativen IL-4-cDNA-Menge

Für die relative Quantifizierung wurde bei der Auswertung der „Real-Time“-PCR der Reaktionsverlauf der zu untersuchenden Gene mit dem der Housekeeping-Gene verglichen. Dabei wurde das wachsende Fluoreszenzsignal jeder PCR-Reaktion graphisch gegenüber der Zyklenzahl aufgetragen.

Von jeder cDNA-Probe wurde eine simultane Amplifikation von z. B. IL-4 und eines Housekeeping-Gens (18S rRNA) durchgeführt, so dass die erhaltenen  $C_t$ -Werte beider qPCR Reaktionen miteinander verrechnet werden konnten. Dafür wurde die Differenz der  $C_t$ -Werte bei der Reaktionen – der sogenannte  $\Delta C_t$ -Wert ( $\Delta C_t$ ) – bestimmt.

$$C_t \text{ IL-4} - C_t \text{ 18s rRNA} = \Delta C_t$$

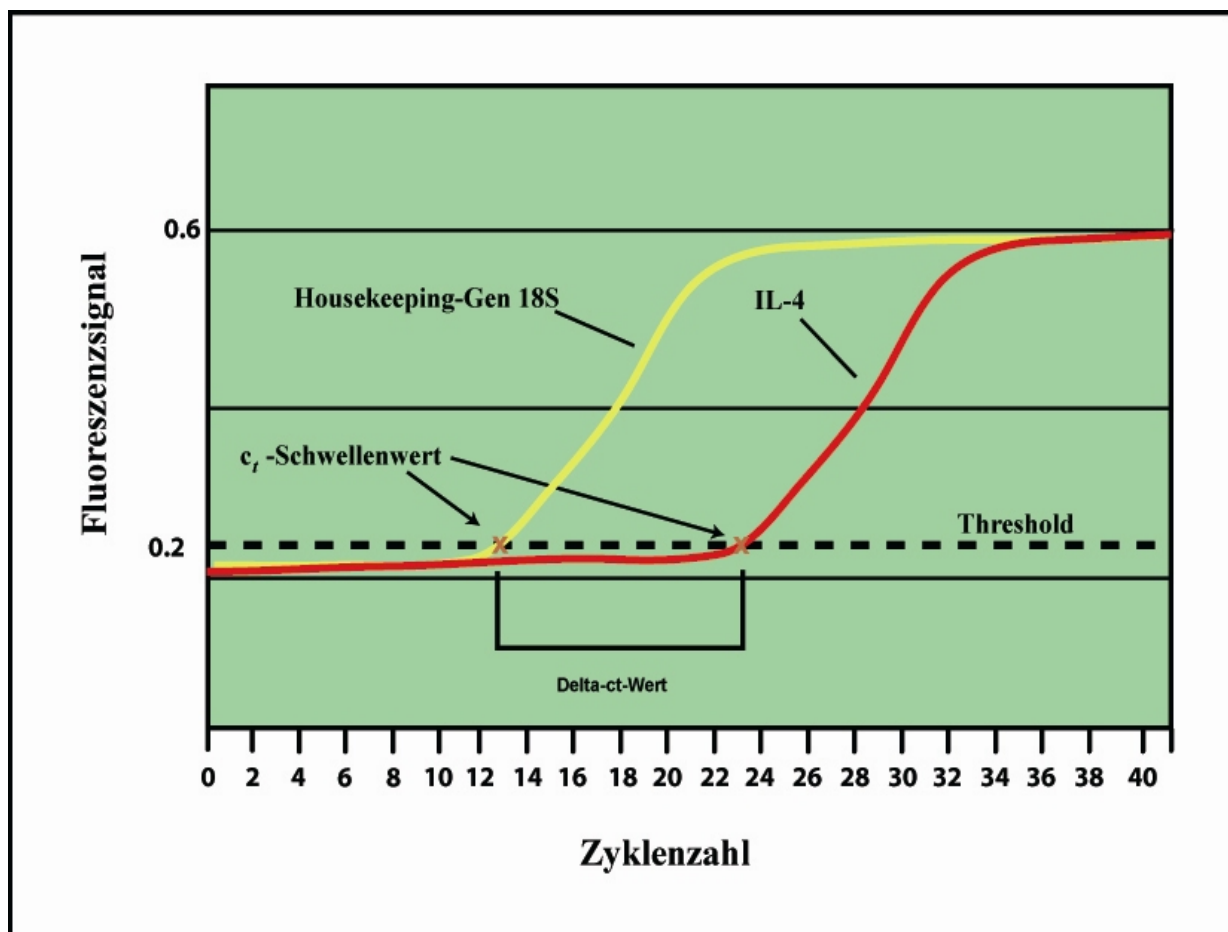


Abb. 4-7: Bestimmung des  $\Delta C_t$ -Wertes

Das vorliegende Beispiel in Abb. 4-7 zeigt für die Referenzreaktion des Housekeeping Gens einen  $C_t$ -Wert von ca. 13 und für die Amplifikation von IL-4 einen  $C_t$ -Wert von ca. 24, woraus sich ein  $\Delta C_t$ -Wert von elf ergibt.

Das Fluoreszenzsignal der Referenzreaktion erreichte bereits nach 13 Zyklen den Schwellenwert, da hier die Menge an Proben-cDNA von 18S rRNA größer war als bei der PCR Reaktion für IL-4, die erst bei 24 Zyklen den Schwellenwert überschritt. Dies verdeutlichte, dass das Referenzgen stärker exprimiert wurde als IL-4.

Unter der Bedingung, dass sich die Amplifikatmenge im exponentiellen Wachstumsbereich mit jedem Zyklus annähernd verdoppelte, konnte die IL-4-Menge relativ zur Menge des konstant exprimierten Housekeeping-Gens quantifiziert werden. Der  $\Delta C_t$ -Wert gab die Differenz der Schwellenwert-Zyklenzahlen der IL-4-Amplifikation und 18S rRNA-Amplifikation an und verdeutlicht so die Expression von IL-4 relativ zur Expression des Referenz-Gens. Je kleiner der  $\Delta C_t$ -Wert, desto größer ist die Expressionsrate für das zu untersuchende Gen.

#### **4.1.11.1.1. Berechnung der relativen IL-4-cDNA-Menge relativ zu einer internen Kontrolle**

Um die relative IL-4-Menge verschiedener cDNA-Proben (z.B.: 1, 2,...) in Bezug zum Basiswert (0) zu berechnen, wurde die vergleichende  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet. Dabei wurde die relative IL-4-cDNA-Menge ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) aus den mittleren  $C_t$ -Werten der jeweiligen Dreifachansätze für IL-4 und 18S rRNA nach folgenden Formeln ermittelt:

$$\text{I.} \quad C_t \text{ IL-4}_{(1)} - C_t \text{ 18 S}_{(0)} = \Delta C_{t(a)}$$

$$\text{II.} \quad \Delta C_{t(a)} - \Delta C_{t(b)} = \Delta\Delta C_t$$

Der  $\Delta\Delta C_t$ -Wert gibt die Differenz der Schwellenwert-Zyklenzahlen einer IL-4-Amplifikation und 18S rRNA-Amplifikation relativ zum Basiswert an. Die relative IL-4-cDNA-Menge wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{n-fache Expression (Probe zu unbehandelte Kontrolle)} = \text{Effizienz}^{-\Delta\Delta C_t}$$

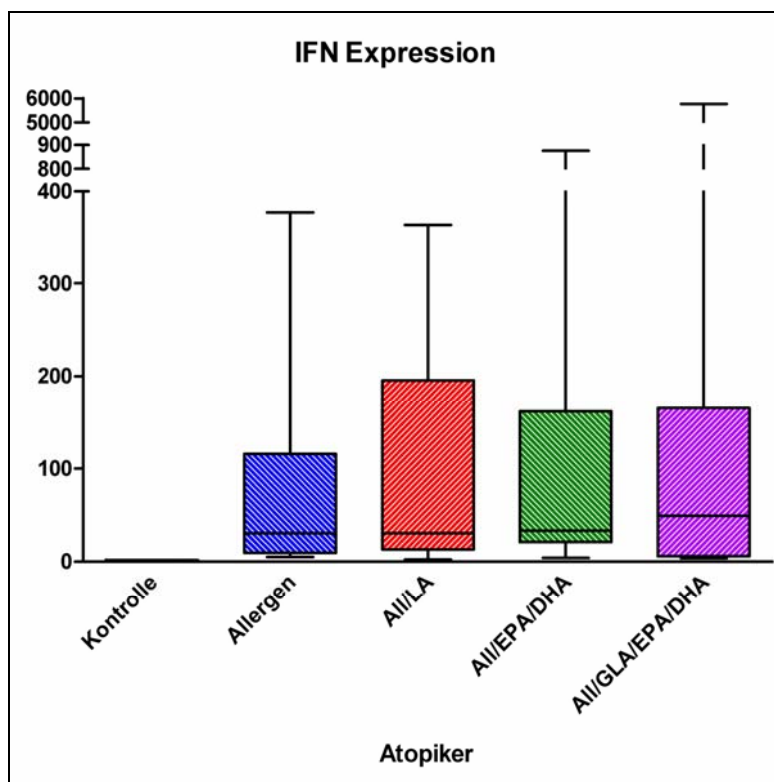
#### 4.1.11.2. Vergleich der Effizienzen der Zielgene und Referenzreaktionen

Bei der relativen Quantifizierung wird die Zielsequenzreaktion (IL-4, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) mit der Referenzreaktion (18S rRNA) verrechnet. Dies wird durchgeführt, um eine Sicherstellung einer jeweils identischen Probenmenge cDNA zu gewährleisten. Für die Anwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnung (vgl. Kapitel IV, 4.1.11.1.1.) muss die Effizienz der IL-4-, IFN- $\gamma$ -, TGF- $\beta$ -Reaktion und der 18S rRNA-Reaktion nahezu gleich sein.

#### 4.1.12. Resultate der Zytokin-Expressionen

##### 4.1.12.1. Interferon- $\gamma$ Expression

Aus der Gruppe der T<sub>H</sub>1-Zellen wurde die Expression von IFN- $\gamma$  bestimmt. Innerhalb der Atopiker- und der Kontrollgruppe wurden die Expressionsintervalle jeweils auf die Kontrolle und auf das Allergen normalisiert.



**Abb. 4-8: PBLs von Atopikern wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IFN- $\gamma$  gemessen**

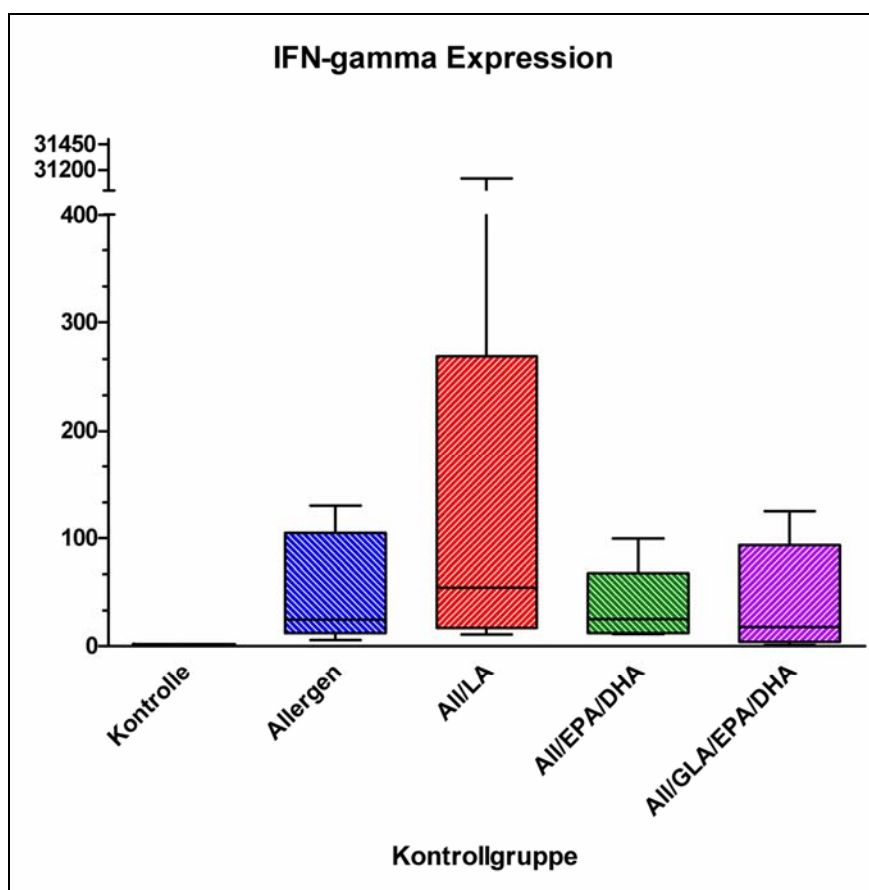
Signifikante Änderungen der Expression konnten bei folgenden Proben ermittelt werden:

**Tab. 4-7: Änderungen der Expression von IFN- $\gamma$  bei Hunden mit atopischer Dermatitis nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf die Kontrolle und auf das Allergen. P = 0.0002, post Test**

Normalisierung auf	Vergleich		Signifikanz
Kontrolle	Kontrolle	Allergen	P < 0.05
Kontrolle	Kontrolle	LA	P < 0.01
Kontrolle	Kontrolle	EPA/DHA	P < 0.001
Kontrolle	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	P < 0.05
Allergen	Kontrolle	Allergen	P < 0.05
Allergen	Kontrolle	LA	P < 0.01
Allergen	Kontrolle	EPA/DHA	P < 0.001
Allergen	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	P < 0.05

Bei Hunden mit atopischer Dermatitis konnte eine signifikante Zunahme der Expression von IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Die deutlichste Zunahme konnte bei der Stimulation der PBLs mit Allergen und GLA/EPA/DHA gemessen werden.

Die Gruppe der Atopiker hatte zusätzlich die größte Standardabweichung. Die höchste statistische Signifikanz mit P < 0.001 wurde bei der Stimulation mit EPA/DHA gemessen.



**Abb. 4-10:** PBLs der Kontrollgruppe wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IFN- $\gamma$  gemessen

Auch bei gesunden Hunden konnten durch die Zugabe von Allergen statistisch signifikante Veränderungen der IFN- $\gamma$ -Expression nachgewiesen werden (siehe unten).

**Tab. 4-8:** Änderungen der Expression von IFN- $\gamma$  von gesunden Hunden nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf die Kontrolle ( $P = 0.0001$ ) und das Allergen ( $P = 0.0025$ ), post Test

Normalisierung auf	Vergleich		Signifikanz
Kontrolle	Kontrolle	Allergen	$P < 0.01$
Kontrolle	Kontrolle	LA	$P < 0.001$
Kontrolle	Kontrolle	EPA/DHA	$P < 0.05$
Kontrolle	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	$P < 0.05$
Allergen	Kontrolle	LA	$P < 0.001$

#### 4.1.12.2. IL-4 Expression

Aus der Gruppe der T<sub>H</sub>2-Zellen wurde die Expression von IL-4 bestimmt.

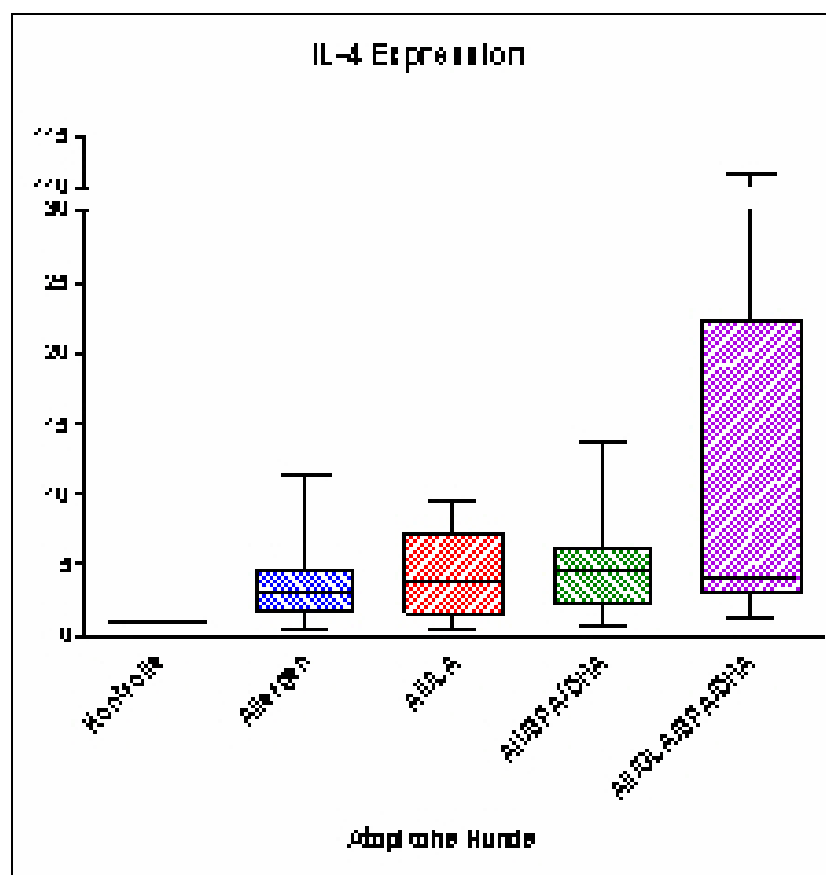
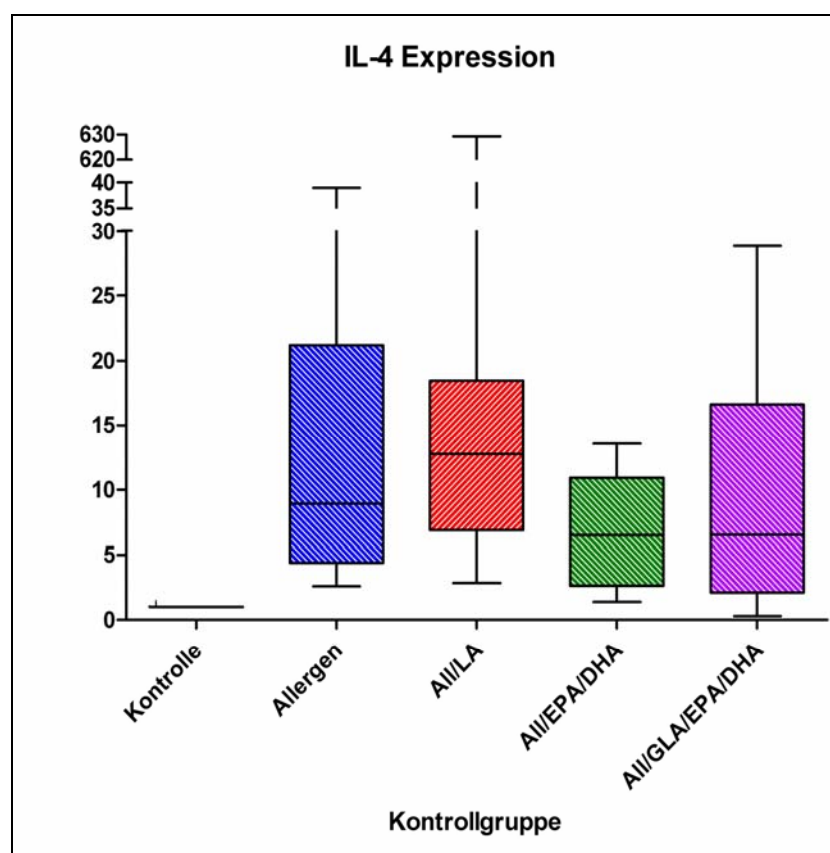


Abb. 4-10: PBLs von Atopikern wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IL-4 gemessen

Tab. 4-9: Änderungen der Expression von IL-4 bei Hunden mit atopischer Dermatitis nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf die Kontrolle (P = 0.0001) und das Allergen (P = 0.0025), post Test

Normalisierung auf	Vergleich		Signifikanz
Kontrolle	Kontrolle	EPA/DHA	P < 0.05
Kontrolle	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	P < 0.01
Allergen	Kontrolle	EPA/DHA	P < 0.05
Allergen	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	P < 0.01

Eine Normalisierung auf das Allergen und auf die Kontrolle erbrachte identische Ergebnisse. Die graphische Darstellung der Normalisierung auf das Allergen entspricht der graphischen Darstellung auf die Normalisierung auf die Kontrolle und wurde aus diesem Grunde nicht dargestellt.



**Abb. 4-11:** PBLs der Kontrollgruppe wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IL-4 gemessen

**Tab. 4-10:** Änderungen der Expression von IL-4 bei gesunden Hunden nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf die Kontrolle ( $P = 0.0001$ ) und das Allergen ( $P = 0.0025$ ), post Test

Normalisierung auf	Vergleich		Signifikanz
Kontrolle	Kontrolle	Allergen	$P < 0.01$
Kontrolle	Kontrolle	LA	$P < 0.001$
Kontrolle	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	$P < 0.05$
Allergen	Kontrolle	Allergen	$P < 0.05$
Allergen	Kontrolle	LA	$P < 0.01$
Allergen	Kontrolle	GLA/EPA/DHA	$P < 0.01$

Bei Hunden mit atopischer Dermatitis konnte eine Zunahme der IL-4 Expression gemessen werden, diese Zunahme war am deutlichsten bei der Zugabe von Allergen und GLA/DHA/EPA zu sehen. Die Minimum-Values haben allerdings ebenfalls bei allen Patienten zugenommen. Dies verdeutlicht, dass es bei allen Patienten zu dieser Zunahme kam.

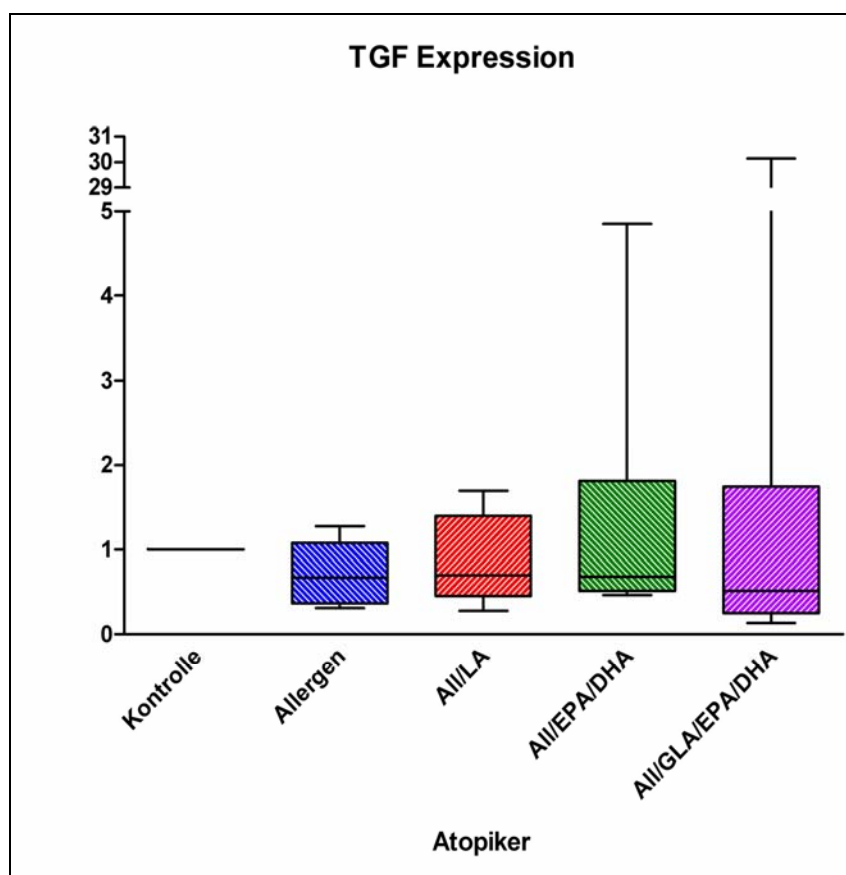
Bei gesunden Hunden war die Zunahme der Expression noch deutlicher, allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und atopischen Hunden zu sehen.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass durch die Stimulation mit Allergen die Expression von IL-4 zunahm, essentielle Fettsäuren diese Zunahme aber nicht inhibieren konnten.



### 4.1.12.3. TGF- $\beta$ Expression

TGF- $\beta$  wurde zur Expressionsbestimmung aus der Gruppe der regulatorischen T-Zellen untersucht.

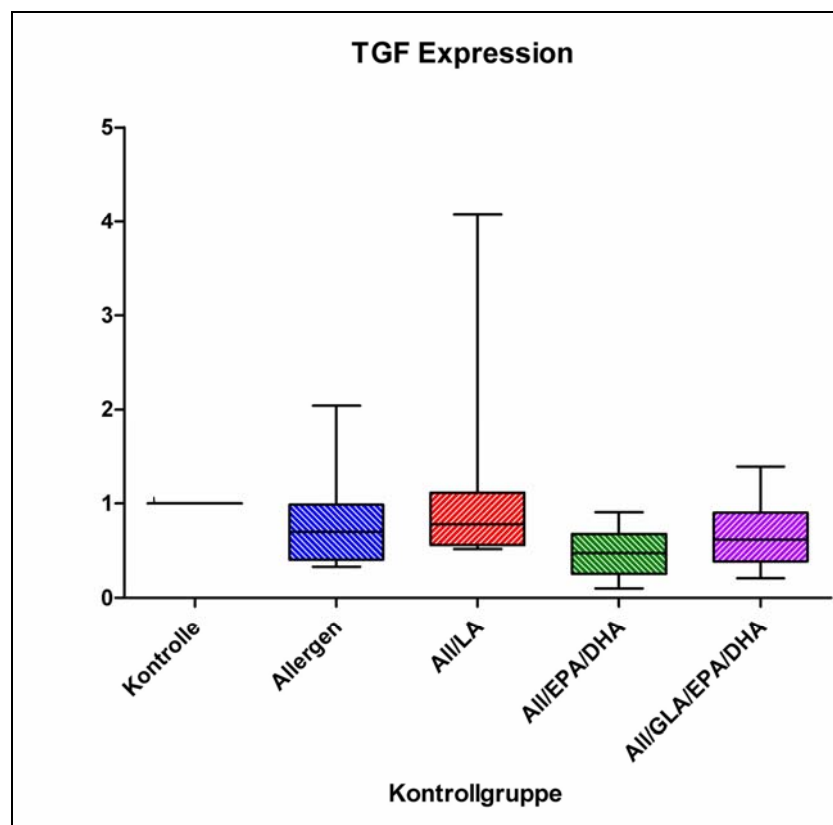


**Abb. 4-12:** PBLs von Atopikern wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von TGF- $\beta$  gemessen

Folgende Ergebnisse erbrachte die statische Auswertung der TGF- $\beta$ -Expressionen von Hunden mit atopischer Dermatitis:

**Tab. 4-11:** Bei der Berechnung wurde der Friedman Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest,  $P = 0.3745$  eingesetzt:

Normalisierung auf	Signifikanz
Kontrolle	Nicht signifikant
Allergen	Nicht signifikant



**Abb. 4-13: PBLs von gesunden Hunden wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von TGF- $\beta$  gemessen**

Bei der statischen Auswertung der Ergebnisse der gesunden Hunde konnten folgende Ergebnisse erbracht werden:

**Tab. 4-12: Darstellung der Expressionen von TGF- $\beta$  von gesunden Hunden, P = 0.0022:**

Normalisierung auf	Vergleich		Signifikanz
Kontrolle	Kontrolle/Allergen	alle Fettsäuren	Nicht signifikant
Allergen	Kontrolle	EPA/DHA	P < 0.001

Durch die Supplementierung von EPA/DHA konnte die Expression von TGF- $\beta$  bei gesunden Hunden signifikant gesenkt werden (P < 0.001).

Die anderen essentiellen Fettsäuren (LA, GLA/EPA/DHA) hatten weder bei gesunden noch bei atopischen Hunden einen signifikanten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$ .

#### 4.1.13. Vergleich der Zytokinexpressionen zwischen gesunden und atopischen Hunden

Der Vergleich wurde mit einem Kruskal Wallis Test kombiniert mit einem Dunn's Post Test durchgeführt. Folgende Ergebnisse konnten evaluiert werden:

**Tab. 4-13: Zytokinexpressionen im Vergleich zwischen Hunden mit atopischer Dermatitis und gesunden Hunden, Dunn's Post Test:**

Zytokin	Normalisierung auf	P-Werte	Signifikanz
IL-4	Kontrolle	$P > 0.05$	Keine Signifikanz
IL-4	Allergen	$P > 0.05$	Keine Signifikanz
IFN- $\gamma$	Kontrolle	$P > 0.05$	Keine Signifikanz
IFN- $\gamma$	Allergen	$P > 0.05$	Keine Signifikanz
TGF- $\beta$	Kontrolle	$P > 0.05$	Keine Signifikanz
TGF- $\beta$	Allergen	$P > 0.05$	Keine Signifikanz

Essentielle Fettsäuren und Allergen (*D.farinae*) können die Zytokinexpression nicht wesentlich verändern, es konnte keine statistische Signifikanz zwischen den Zytokinexpressionen der einzelnen Zytokine im Vergleich zwischen gesunden und atopischen Hunden nachgewiesen werden. Die Exprimierung von Zytokinen bei T-Zellen atopischer genauso wie gesunder Hunde sind durch eine Inkubation mit essentiellen Fettsäuren in der Regel nicht zu beeinflussen. In den Proliferationsversuchen konnten im Vergleich zu diesen Versuchen ein signifikant niedriger Proliferationsindex durch die Inkubation mit Fettsäuren und Allergen erreicht werden.

## V Diskussion

### 5.1. Einfluss der Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren Blutleukozyten

In dieser Studie konnte durch eine Inkubation von PBLs mit verschiedenen Fettsäuren und *D. farinae* eine signifikante Senkung der Proliferationsindices nachgewiesen werden.

Klinische Studien zeigten, dass essentielle Fettsäuren eine Alternative zur Glukokortikoidtherapie in der Behandlung der caninen atopischen Dermatitis darstellen (Bond, 1992, Logas, 1994). Als verantwortliche Mechanismen für eine Besserung der klinischen Symptomatik wurden anfangs Veränderungen in der Eicosanoid-Produktion oder eine gesteigerte epidermale Barrierefunktion vermutet. In der Humanmedizin sind in den letzten Jahren allerdings auch zunehmend Berichte über die Beeinflussung des zellulären Immunsystems durch Fettsäuren erschienen (Calder, 2001b, Caughey et al., 1996, Homey et al., 2006, Miles et al., 2004). Ob eine Leukozytenproliferation gehemmt und resultierend daraus Zytokine als Folgemetaboliten verringert synthetisiert werden, sollte in dieser Studie erforscht werden.

### 5.2. Einfluss auf die Immunantwort

In der Humanmedizin gewinnt der Einfluss der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf die Immunantwort zunehmend an Beachtung. PUFA können das Immunsystem durch den Einfluss auf Second Messenger, Regulatoren der Signaltransduktion oder Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Hwang, 2000). Es wurde von einer Inhibierung der T-Zellproliferation (Fan et al., 2004), IL-2 Produktion (Fan et al., 2004) und Modulation der Membranstruktur von T-Zellen (Richieri und Kleinfeld, 1990) berichtet. Zusätzlich wurde durch PUFA-Supplementierung der IL-2-Rezeptor Signalweg (Li et al., 2005), die MHC II Expression und Antigenpräsentation gemindert (Hughes et al., 1996).

NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen vieler Zytokine inklusive IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  reguliert (Krakauer, 2004). Fischöl oder aufgereinigte DHA reduzieren eine NF- $\kappa$ B Aktivität, senken die IL-2 Sekretion und die T-Zellaktivität beim Menschen auf ein normales Niveau (Fan et al., 2004). Die Resultate unserer Studie zeigen beim Hund ebenfalls einen Einfluss der PUFA auf die PBL-Proliferation. Dies könnte die entzündungshemmenden und somit juckreizmindernden klinischen Effekte einer Fettsäuren-Supplementierung erklären.

Das Sinken der PBL-Proliferationsindices nach einer Inkubation mit verschiedenen PUFA und *D. farinae* war bei allen gesunden Hunden der Kontrollgruppe signifikant, mit Ausnahme der Inkubation mit LA. In der Gruppe der atopischen Hunde waren alle Inkubationen mit PUFA statistisch signifikant erniedrigt, mit Ausnahme von LA und GLA. In den Ergebnissen der vorliegenden Studie hatte EPA/DHA eine bessere Wirkung als LA. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass Omega-3-Fettsäuren die Gesundheit bei Mensch und Hund positiv beeinflussen (Calder, 2006, Endres et al., 1989, Logas, 1994, Scott et al., 1997), während Omega-6-Fettsäuren etwas weniger unterstützende Auswirkungen haben. In vielen Studien konnten bei einer Kombination von Omega-3-Fettsäuren mit Omega-6-Fettsäuren positive Resultate festgestellt werden. Die positiven Effekte werden mit dem Einbau in die Zellmembranen erklärt, auf Grund dessen die Produktion an proinflammatorischen Eicosanoiden und Zytokinen sinkt (Stubbs und Smith, 1984). Bei Mäusen wurde durch eine gesteigerte Omega-3-Fettsäuren-Supplementierung einer Omega-3/Omega-6-Fettsäuren Diät eine verringerte Anfälligkeit für anaphylaktoide Reaktionen gesehen (Watanabe et al., 1994). Ratten reduzieren ihre Thrombozytenbildung nach der Senkung einer Fettsäurenkomponente (Perillaöl). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Senkung der Leukotrienaktivität. Alle Produkte der 5-Lipoxygenase unterstützen die Thrombozytenbildung (Horii et al., 1991).

Antiinflammatorische Wirkungen wurde GLA in verschiedenen Studien zugeschrieben, hier wurde ein Senken der T-Lymphozytenproliferation nachgewiesen (Rossetti et al., 1997). Mueller und Fieseler (2004) konnten eine hohe Wirkung von EPA und DHA (141mg/kg KGW/Tag mit einer 50 %igen klinischen Verbesserung) im Vergleich zu ALA (327mg/kg KGW/Tag mit einer 28 %igen klinischen Verbesserung) nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine Konversion von ALA zu EPA eventuell limitiert ist.

In der vorliegenden Studie konnten mit Con A und LA, ALA, GLA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA inkubierte PBLs atopischer Hunde in ihrer Proliferation nicht gesenkt werden. Eine mögliche Begründung für dieses Phänomen ist die bereits bestehende Aktivierung der T-Zellen auf Grund der atopischen Dermatitis. Die Kombination von erhöhter T-Zellaktivität und zusätzlicher starker Stimulation durch Con A könnte die supprimierende Wirkung der Fettsäuren kompensieren.

In dieser Studie wurden PBLs *in vitro* mit essentiellen Fettsäuren in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M stimuliert. Diese Konzentration erzielte in Vorversuchen die höchsten Proliferationshemmungen im Vergleich zu anderen Konzentrationen. Ob diese Konzentration *in vivo* die gleichen Effekte auslösen kann, sollte in weiterführenden klinischen Studien ausgetestet werden. Auf Grund der unterschiedlichen selektiven Akkumulation in Membranen ist es schwie-

rig, Konzentrationen *in vivo* mit Konzentrationen *in vitro* in Vergleich zu setzen (Stubbs und Smith, 1984). Auf der Grundlage von Versuchen zur Evaluierung von PUFA-Konzentrationen im Serum (Mueller et al., 2005b) wurden in der vorliegenden *in vitro*-Studie vergleichbare Konzentrationen verwendet. Mueller *et al.* (2005) untersuchten die PUFA-Konzentrationen atopischer Hunde im Serum und in der Haut, nachdem ihnen Omega-3-Fettsäuren supplementiert wurden (Mueller et al., 2005b). Weder die PUFA-Konzentration im Serum und der Haut noch ein Sinken in der Produktion der entzündlichen Eicosanoide waren mit der klinischen Symptomatik oder den Behandlungserfolgen in Korrelation. Die Autoren vermuten, dass die Wirksamkeit von mehreren Faktoren als der Dosis und dem Omega-3/Omega-6-Verhältnisses abhängt. Bisher nicht identifizierte idiosynkratische Faktoren könnten für individuelles Ansprechen der einzelnen Patienten verantwortlich sein (Mueller et al., 2005b). Möglicherweise ist die Konzentration der Fettsäuren in den Membranen der an der Immunantwort beteiligten Zellen wichtiger als die durchschnittliche Serum- oder Hautkonzentration. In einer Studie von Fuhrmann *et al.* (2006) wurden Veränderungen von Membranstrukturen an Erythrozyten und Zellen des Plasmas bei atopischen Hunden und gesunden Hunden untersucht. Jeder atopische Patient wurde mit einem gesunden Hund verglichen, der im selben Haus wohnte und identisches Futter erhielt. In der Membranstruktur der Erythrozyten konnten statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Begründet wurde diese Feststellung mit der Reduktion der Delta-6-Desaturase- und Delta-5-Desaturase-Folgemetaboliten bei Hunden mit atopischer Dermatitis (Fuhrmann et al., 2006).

Essentielle Fettsäuren werden in der Dermatologie sehr häufig in einem Verhältnis Omega-6:Omega-3 von 5:1 eingesetzt. Diese Empfehlung basiert auf einer Studie, in welcher die höchste Inhibierung von LTB<sub>4</sub> von einer Diät mit einem Gehalt an Omega-6:Omega-3 von 5:1 ausgetestet wurde. Vaughn *et al.* (1994) beschreiben die Effekte einer diätetischen Supplementierung mit einer gesteigerten Ration von Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren in Zusammenhang mit einer veränderten Leukotrien B Synthese in der Haut von Hunden. Hunden, welchen eine Diät im Verhältnis 5:1 und 10:1 gefüttert wurde, synthetisierten 30 - 33 % weniger LTB<sub>4</sub> ( $p < 0.05$ ) und 370 - 500 % mehr LTB<sub>5</sub> nach sechs und zwölf Wochen Fettsäuren-Supplementierung. Verschiedene andere Rationen (25:1, 50:1 und 100:1) ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Synthese von LTB<sub>4</sub> in neutrophilen Granulozyten (Vaughn, 1994). Andere Rationen, wie beispielsweise Verhältnisse von 1:1 oder 1:2, wurden von verschiedenen Autoren beschrieben. Byrne *et al.* (2000) zeigten in einer Studie, dass es zu einer signifikanten Senkung von LTB<sub>4</sub> durch eine hohe Konzentration von Omega-3-Fettsäuren (n-6:n-3 Ration von 0,7) führen kann (43 % weniger LTB<sub>4</sub>). In dieser Studie wurden alternativ

ebenfalls niedrige Dosen von Omega-3-Fettsäuren und hohe Dosen von Omega-6-Fettsäuren (n-6:n-3 Ration von 45:1) den Tieren zugeführt. Hier konnte kein signifikanter Unterschied gesehen werden (Bryne, 2000).

Eine achtwöchige Studie von Nesbitt *et al.* (2003), in der essentielle Fettsäuren EPA und DHA in verschiedenen Verhältnissen (Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren 1:1, 3:1, 6:1, 27:1) bei Hunden mit Juckreiz verglichen wurden, zeigte in allen vier Gruppen eine signifikante Verbesserung des klinischen Punktwertes (Nesbitt *et al.*, 2003). Die Diät mit einem hohen Fettsäureanteil und dem niedrigsten Omega-6 zu Omega-3 Verhältnis (1:1) bewirkte eine deutlich erniedrigte Serumkonzentration von entzündungsförderndem PGE<sub>2</sub>. Außerdem zeigte diese Studie, dass Hunde, die Diäten mit einem erhöhten Omega-3-Fettsäureanteil zu fressen bekamen, auch erhöhte Omega-3-Fettsäuren im Plasma aufwiesen. Weder die Dosis der Omega-3-Fettsäuren, noch das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren schienen alleine verantwortlich für die Veränderungen zu sein.

Eine Studie von Abba *et al.* (2005) verglich die Wirkung von essentiellen Fettsäuren (Omega-6:Omega-3-Verhältnis von 5,5:1) auf zwei Hundegruppen in unterschiedlichen Stadien der atopischen Dermatitis. In einer Gruppe waren Hunde im Frühstadium der AD (bislang noch keine Behandlung), die andere Gruppe bestand aus Hunden im Spätstadium der AD (chronische AD, kein Ansprechen auf Immuntherapie). Beide Gruppen erhielten über acht Wochen eine standardisierte Diät und eine tägliche Fettsäuren-Supplementierung. Der Juckreiz besserte sich bei 53 % der Hunde im Frühstadium und bei 14 % der Hunde im chronischen Stadium der AD. Außerdem konnte eine deutliche Verringerung der Arachidonsäure im Serum der Hunde der ersten Gruppe, und eine Erhöhung der  $\gamma$ -Linolensäure der Hunde der zweiten Gruppe festgestellt werden. Diese Veränderungen könnten, laut den Autoren, einen Hinweis auf den unterschiedlichen Fettsäuren-Metabolismus bei den Patienten mit verschiedenen Schweregraden der AD geben und dies könnte somit einen Einfluss auf die klinischen Erscheinungen haben (Abba *et al.*, 2005).

Immunmodulatorische Eigenschaften konnten ebenfalls in einer Studie nachgewiesen werden, in der es durch eine mit Omega-3-Fettsäuren angereicherten Diät zu einer verminderten Produktion an Serum IgE und einer gesteigerten Synthese von IgG und IgA in Ratten kam (Gu *et al.*, 1995).

In einer doppelt verblindeten Studie wurde ein Vergleich von Olivenöl mit einer Kombination von Nachtkerzenöl und Fischöl ausgetestet. Olivenöl enthält keine Omega-6-Fettsäuren und nur minimal Omega-3-Fettsäuren. Es zeigte nur einen geringen Effekt als Therapeutikum

bei atopischen Hunden (Bond und Lloyd, 1992). In einer Studie von Harvey *et al.* wurde bei einer Verabreichung von Nachtkerzenöl und Fischöl eine klinische Verbesserung beobachtet (Harvey, 1993). Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro* Studie, in welcher die höchste Senkung der Proliferationsindices bei einer Kombination von Omega-6/Omega-3-Fettsäuren ausgelöst wurde und somit durch eine Senkung der Entzündungszellen auch eine klinische Verbesserung erklärt werden kann.

Resultierend aus verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass beim Einzelpatienten verschiedene Fettsäuren ausprobiert werden sollten, da manche Fettsäuren bei bestimmten Hunden klinische Veränderungen bewirken, bei anderen wiederum nicht (Scott *et al.*, 1992).

Niedrigere Einnahmen von ALA (2-9,5 g/Tag) scheinen Entzündungen und Immunantwort beim Menschen nur wenig zu reduzieren (Healy *et al.*, 2000, Kew *et al.*, 2003, Thies *et al.*, 2001a, Thies *et al.*, 2001b, Thies *et al.*, 2001c, Wallace *et al.*, 2003). Ein Grund für die geringen Auswirkungen von ALA könnte die Konversion in eine längere Fettsäure wie EPA oder DHA sein, welche beim Menschen limitiert ist (Burdge *et al.*, 2002, Burdge und Wootton, 2002). Dies könnte aufgrund einer geringen Delta-6-Desaturase Aktivität (Huang *et al.*, 1990, Yamazaki *et al.*, 1992) und/oder auf Grund des inhibitorischen Effekts einer hohen Einnahme der Omega-6-Fettsäure LA auf die ALA-Konversion der Fall sein (Miles *et al.*, 2004). In der Humanmedizin wurde nachgewiesen, dass bei Kindern mit atopischer Dermatitis im Gegensatz zu gesunden Kindern höhere Konzentrationen an Linolensäure und niedrigere Mengen an Metaboliten der Linolensäure vorkamen (Camp, 1982, Lindskov und Holmer, 1992, Morse *et al.*, 1989). Zu Grunde liegend konnte ebenfalls ein Defekt der Delta-6-Desaturase nachgewiesen werden. Diese Kinder wurden mit Nachtkerzenöl, ein stark mit  $\gamma$ -Linolensäure angereichertes Öl, mit gutem Effekt gegen Juckreiz behandelt (Schalin-Karrila *et al.*, 1987). Welche Rolle ein Mangel an Delta-6-Desaturase in der Pathogenese der AD spielt, ist in der Tiermedizin noch nicht eindeutig geklärt. Saevik *et al.* (2002) untersuchten in einer Studie Hunde mit atopischer Dermatitis im Zusammenhang mit einem eventuellen pathologischen Fettmetabolismus und einer reduzierten Desaturaseaktivität. Bei Hunden mit atopischer Dermatitis, sowie bei gesunden Hunden wurden Fettsäurespiegel im Serum verglichen. Es konnten keine Unterschiede gesehen werden (Saevik *et al.*, 2002). Weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung von einem eventuellen lokalen Desaturase-Mangel in der Haut wären von Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurden in jedem Versuchsansatz die gleichen Konzentrationen von verschiedenen essentiellen Fettsäuren ausgewählt und GLA/EPA/DHA im Verhältnis Omega-3:Omega-6-Fettsäuren von 2:1 eingesetzt. Dies führte zur höchsten Suppression der



PBL-Proliferation bei atopischen Hunden nach einer Inkubation mit Allergen. Dieses Versuchsergebnis stimmt mit Angaben aus der Literatur in Bezug auf das Fettsäuren-Konzentrationsverhältnis überein (Bryne, 2000). Eine Kombination von Omega-3/Omega-6-Fettsäuren in einem niedrigen Konzentrationsverhältnis (2:1) erzielt die höchste Inhibierung der PBL-Proliferation und daraus resultierend die effektivsten klinischen Juckreizreduzierungen. Zusammenfassend lässt sich dies höchstwahrscheinlich mit einer verringerten Proliferation von peripheren Blutleukozyten und bestimmten Folgemetaboliten begründen. Daraus resultiert eine geringere kutane Entzündungsreaktion. Leukotriene scheinen in der Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis keine wesentliche Rolle zu spielen. Durch den Einbau von EPA und DHA in die Zellmembran kommt es zusätzlich zur gesteigerten epidermalen Barrierefunktion.

### **5.3. Untersuchung von Zytokinen**

In der Human- und der Veterinärmedizin wurden in den letzten Jahren bereits viele Zytokine in Organgeweben und Körperflüssigkeiten untersucht. Die Gründe für dieses Interesse liegen in der Beteiligung von Zytokinen an vielen pathophysiologischen Prozessen, und dem schnellen und bedeutenden Anstieg der Zytokinkonzentrationen bei verschiedenen Infektionskrankheiten (Bienvenu et al., 1998). Während der Nachweis von Zytokinen des Menschen und der Maus durch etablierte Systeme keine Schwierigkeit mehr darstellt, sind der Untersuchung von Zytokinen in der Veterinärimmunologie Grenzen gesetzt (Jungi, 1999). Auf Grund der speziesspezifischen Besonderheiten der Zytokinfunktionen lassen sich Untersuchungsergebnisse an Mäusen nicht unbedenklich auf Haustierspezies übertragen (Jungi, 1999). Durch die Entwicklung einer Vielzahl von Techniken und Reagenzien und auf Grund der konservierten Natur genetischer Information ist es jedoch möglich, auf zellulärer und molekularer Ebene viele Zytokine verschiedener Spezies zu untersuchen. So wurde beispielsweise unter Zuhilfenahme übereinstimmender Nukleinsäuresequenzen von Mensch und Maus Oligonukleotidprimer für die Bestimmung von feliner Zytokin-mRNA durch RT-PCR (Real-Time-Polymerasekettenreaktion) hergestellt (Rottman et al., 1996). Diese Technik, mit der geringe Mengen zirkulierender mRNA entdeckt werden können, nutzten Wissenschaftler zur Untersuchung von Zytokinen bei Hunden (Aihara et al., 2001, Chamizo et al., 2001, Grone et al., 1998), Katzen (Kipar, 2001, Leutenegger, 1999), Schafen (Anderson et al., 2001) und Rin-

dern (Collins et al., 1999, Leutenegger et al., 2000, Waldvogel et al., 2000). In verschiedensten Bereichen werden mittlerweile bei Hunden Zytokinbestimmungen durchgeführt:

- Bei allergischen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (Hayashiya et al., 2002, Nuttall et al., 2002a, Olivry et al., 1999)

- Bei bakteriellen und viralen Erkrankungen wie Borreliose (Straubinger et al., 1998), Staupe (Grone et al., 2000, Grone et al., 2002, Grone et al., 1998, Markus et al., 2002) und der caninen Parvovirose (Leopold-Temmler, 2002). Bei Untersuchungen an natürlich und experimentell mit Parvovirus infizierten Hunden reduzierte die Applikation des Interferon- $\gamma$  die Mortalitätsrate und milderte die klinische Symptomatik der parvoviralen Enteritis (de Mari et al., 2003, Ishiwata et al., 1998, Martin et al., 2002)

- Bei parasitären Infektionen wie Leishmaniose (Chamizo et al., 2001, Pinelli et al., 1999a, Pinelli et al., 1999b, Quinnell et al., 2001a, Quinnell et al., 2001b) und Demodikose (Tani et al., 2002).

Weitere Schwerpunkte der Erforschung caniner Zytokine bilden Tumorerkrankungen (Helfand et al., 1999, Okano et al., 1997, Okano und Yamada, 2000, Whitley et al., 1995) und Transplantationsmodelle (Fuller et al., 1994, Serrick et al., 1995). Da einige Erkrankungen (z.B. Leishmaniose) sowohl bei Hunden als auch bei Menschen vorkommen, führen veterinärmedizinische klinische Studien auf diesen Gebieten auch zu Erkenntnissen über neue Behandlungsmethoden in der Humanmedizin (Chamizo et al., 2001).

#### **5.4. Einfluss der essentiellen Fettsäuren auf die Zytokin-Expression**

Im zweiten Teil dieser Studie wurde der Einfluss von PUFA auf die Expression von IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  untersucht. Langerhanszellen, welche IgE über ihren hochaffinen IgE-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI binden, sind bei Hunden mit atopischer Dermatitis vorhanden (Olivry et al., 1996). Es wird vermutet, dass sie T<sub>H</sub>2 Zellen aktivieren (Nuttall et al., 2002a). T<sub>H</sub>2 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) werden durch T<sub>H</sub>2 Zellen synthetisiert und induzieren einen Isotypenwandel in B-Zellen, welche wiederum IgE produzieren. Diese Zytokine stimulieren Makrophagen und eosinophile Granulozyten zur Produktion von Mediatoren wie IL-12. Diese Reaktion aktiviert T<sub>H</sub>1 Zellen zur Synthese von T<sub>H</sub>1 Zytokinen. Die Anwesenheit von T<sub>H</sub>1 Zytokinen wie IFN- $\gamma$  ist charakteristisch für chronische Hautläsionen (Werfel et al., 1996). Die Präsenz von T<sub>H</sub>2 Zytokinen (IL-4) ist dahingegen typisch für akute Läsionen (Sinke et al., 2002). IFN- $\gamma$  unterstützt die zellmedierte Immunität. Die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  produ-

zierenden T-Zellen korreliert mit der Chronizität von Hautläsionen bei AD (Al-Shami et al., 2005, Grewe et al., 1994, Sinke et al., 2002, Ying et al., 2005).

In vielen Studien konnten bisher veränderte Zytokin-Expressionen bei Hunden mit atopischer Dermatitis nachgewiesen werden. Nuttall *et al.* (2002) fanden heraus, dass eine canine atopische Dermatitis mit einer Überproduktion von IL-4 und einer erniedrigten Produktion von TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) in Zusammenhang steht (Nuttall et al., 2002b). Eine erhöhte Konzentration von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 konnte bei Hunden mit auftretenden Hautläsionen im Vergleich mit Hunden ohne Hautläsionen und gesunden Hunden ( $p < 0,05$ ) gesehen werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Transkription von IL-10, IL-6 und IL-12 (Nuttall et al., 2002b).

Hayashiya *et al.* (2002) und Tani *et al.* (2002) zeigten mittels semi-quantitativer RT-PCR und anschließender Densitometrie, dass der Gehalt an IFN- $\gamma$ -mRNA relativ zur GAPDH-mRNA-Konzentration in PBMCs von Hunden mit atopischer Dermatitis signifikant geringer war als in den gesunden Tieren der Kontrollgruppe (Hayashiya et al., 2002, Tani et al., 2002). Hayashiya untersuchte ebenfalls die Expression von IL-4 und IL-10 über eine semiquantitative qPCR bei Hunden mit und ohne atopischer Dermatitis. Die PBMCs wurden zuvor aus peripherem Blut isoliert und die mRNA gewonnen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von IL-4 und IL-10 zwischen beiden Gruppen (Hayashiya et al., 2002). Über die Studien der Zytokinexpressionen von Atopikern kann zusammenfassend gesagt werden, dass in der Mehrzahl der Studien eine erhöhte Expression von IL-4 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen wurde. TGF- $\beta$  wurde nur in wenigen Studien gemessen und war in diesen Studien nur geringgradig exprimiert.

Eine der beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften von Fischöl ist eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Produktion aus PBMCs (Endres et al., 1989). In verschiedenen Studien über die antiinflammatorische Wirkung von Fischöl konnte nicht in allen eine Effektivität nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde nur in sechs von elf Studien ein Suppression von TNF- $\alpha$  beschrieben (Caughey et al., 1996, Endres et al., 1989, Gallai et al., 1995, Kelley et al., 1999, Meydani et al., 1991, Meydani et al., 1993). Alle elf Studien berichteten über hohe Standardabweichungen in der TNF- $\alpha$ -Produktion, dies lässt eine hohe Mischung von Genotypen in der Population vermuten und könnte das Resultat eines hohen Levels an individuellen Variationen in der Antwort auf die Verabreichung von Fischöl sein (Grimble et al., 2002). Auf Grund dieser kontroversen Ergebnisse wurde TNF- $\alpha$  aus der hier vorliegenden Studie ausgeschlossen.

IFN- $\gamma$  und IL-4 wurden in dieser Studie als repräsentative Vertreter der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Antwort ausgewählt. Durch die Inkubation mit Allergenen konnte eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Expression errechnet werden. Diese Zunahme konnte bei gesunden und atopischen Hunden gesehen werden, es kam zu keiner signifikanten Senkung der Expression durch Zugabe von PUFA. Die Zunahme von IFN- $\gamma$  nach Inkubation der PBLs mit Allergenen bestätigt die Angaben in der Literatur in Bezug auf Atopiker. Eine erhöhte Konzentration an IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 konnte bei Hunden mit auftretenden Hautläsionen im Vergleich mit Hunden ohne Hautläsionen und gesunden Hunden ( $p < 0,05$ ) gesehen werden (Nuttall et al., 2002b). IFN- $\gamma$  fördert die Differenzierung von nativen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Untereinheiten und inhibiert die Proliferation von T<sub>H</sub>2 Zellen (siehe Abb.2-7). Einen Teil der T<sub>H</sub>1-Reaktion auslösenden Effekte von IFN- $\gamma$  wird direkt durch aktivierte mononukleäre Zellen ausgelöst. Zwar konnte in der vorliegenden Studie keine statistische Signifikanz zwischen atopischen und gesunden Hunden errechnet werden, aber bei genauer Betrachtung sind die Expressionen bei atopischen Hunden höher ausgeprägt. Höhere Patientenzahlen könnten eventuell eine statistische Signifikanz erzielen. IL-4 zeigte in dieser Studie keine statistisch signifikanten Veränderungen nach Inkubation mit Allergenen im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch durch Zugabe von PUFA veränderte sich die Expression nur geringfügig. Eine mögliche Erklärung könnte eine verringerte Proliferation von T<sub>H</sub>2-Zellen auf Grund der Anwesenheit von T<sub>H</sub>1-Zellen sein. Hayashiya untersuchte über eine semiquantitative qPCR ebenfalls die mRNA-Expression von IL-4 bei Hunden mit und ohne atopischer Dermatitis. Es gab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Expression von IL-4 zwischen beiden Gruppen (Hayashiya et al., 2002).

Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort und Immunregulation (Akdis et al., 2005). Regulatorische T-Zellen sind charakterisiert durch die Sekretion von sogenannten regulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Bei Hunden mit AD ist die TGF- $\beta$  Expression signifikant niedriger als bei gesunden Hunden (Nuttall et al., 2002b). Es ist wichtig für eine Toleranz gegenüber Umweltallergenen in der Peripherie und auf Schleimhäuten bei Menschen und Ratten (Mason und Powrie, 1998). Niedrige TGF- $\beta$  Expressionen könnten einen Niederbruch dieser Toleranz bedeuten. TGF- $\beta$  wird in einer inaktiven Form sezerniert (Umetsu und DeKruyff, 1997). Eine Konformation zur aktiven Form ist ein wichtiger Hinweis auf eine pathologische Veränderung in der caninen Haut. In einer neuen Studie von Steinman *et al.* (2007) wurde neben T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen eine neue T<sub>H</sub>-Subklasse definiert und als T<sub>H</sub>17 Zellen bezeichnet. T<sub>H</sub>1 Zellen antagonisieren die Wirkung

von T<sub>H</sub>17 Zellen (Steinman, 2007). Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine Abwesenheit von T<sub>H</sub>1 Zellen entzündliche Reaktionen bei gesunden Individuen auslöst und die Toleranz von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  abhängt.

Shida *et al.* (2004) forschten an den Auswirkungen einer Allergen-spezifischen Immunotherapie auf eine T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Verteilung bei atopischen Hunden. Die Expression der Zytokine wurde vor und nach Injektion der Immuntherapie gemessen. Es wurden keine veränderten Werte von IL-4 nachgewiesen. Das Verhältnis IFN- $\gamma$ /IL-4 stieg jedoch signifikant. Eine Immuntherapie scheint eine Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 zu fördern, ohne jedoch die T<sub>H</sub>2 Aktivität zu beeinflussen. Es induzierte einen Wechsel zu einer T<sub>H</sub>1 Dominanz. Bei Hunden führte dies zu einer Verbesserung der klinischen Symptome (Shida *et al.*, 2004).

Andere Forscher wiederum wiesen eine niedrigere Expression von IFN- $\gamma$ -mRNA bei Hunden mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunden Hunden nach. Zwischen gesunden und atopischen Hunden gab es zusätzlich keinen Unterschied in der IL-4-Expression (Hayashiya *et al.*, 2002). Beide Forschergruppen untersuchten die Zytokinexpressionen mittels RT-PCR und semiquantitativer PCR, direkte Unterschiede in der Methodik sind nicht ersichtlich und können die unterschiedlichen Ergebnisse nicht erklären. Unterschiedliche Populationen mit eventuell unterschiedlichen allergieauslösenden Antigenen könnten die abweichenden Zytokinexpressionen erklären. Um jedoch eindeutigere Ergebnisse zu erhalten, wären weitere Studien in Bezug auf Zytokinexpressionen von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen von Bedeutung.

Mehrere Autoren beschrieben in ihren Studien die gegenläufigen Interaktionen, welche von T<sub>H</sub>17-Zellen und anderen regulatorischen T-Zellen ausgelöst wurden (Bettelli *et al.*, 2006, Tato und O'Shea, 2006, Veldhoen *et al.*, 2006). Eine wichtige Schlüsselfunktion spielt IL-6. Dieses Zytokin unterstützt Entzündungen (Di Marco *et al.*, 2001, Gijbels *et al.*, 1995, Okuda *et al.*, 2000, Samoilova *et al.*, 1998), es ist zusätzlich als akute Phase Zytokin bekannt und induziert die Entstehung von Fieber (Steinman, 2004). Es konkurriert mit TGF- $\beta$  um die Bindung an T<sub>H</sub>17-T-Zellen. TGF- $\beta$  induziert bei Abwesenheit von IL-6 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>. Dieses inhibiert autoimmune Reaktionen und schützt das Gewebe vor Zerstörung (Bettelli *et al.*, 2006, Tato und O'Shea, 2006, Veldhoen *et al.*, 2006). Somit fungiert TGF- $\beta$  als ein kritischer Regulator zum einen als Schutz vor gewebezerstörenden T<sub>H</sub>17-Zellen, wenn diese mit IL-6 kollaborieren, zum anderen als Aktivator von antiinflammatorischen T<sub>res</sub> Zellen, wenn kein IL-6 zur Verfügung steht. Da IL-6 und TGF- $\beta$  immer gegenregulatorisch vorliegen und nur ein Zytokin in der jeweiligen Situation exprimiert wird, wurde in der vorliegenden Studie nur die Expression von TGF- $\beta$  evaluiert. Es konnten aller-

dings keine signifikanten Unterschiede in der Expression durch Zugabe von Allergenen oder PUFA gesehen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass Fettsäurekonzentrationen von  $10^{-5}$  M in *in vitro*-Studien einen Effekt auf die Proliferation auslösen. Dies könnte die positiven klinischen Effekte einer PUFA-Supplementierung erklären. Ferner stellt sich die Frage, welche Leukozyten und resultierend welche Folgemetaboliten die kutane Entzündungsreaktion bei atopischen Läsionen minimieren. Eine Stimulation von PBLs mit PUFA hatte keinen Einfluss auf die Expression von IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  bei atopischen Hunden im Vergleich zu gesunden Hunden. Da in den Versuchen größtenteils identische Ergebnisse im Vergleich der Zytokinexpression zwischen der Kontrollgruppe und den Atopikern gesehen wurden, ist die klinische Verbesserung möglicherweise nicht auf eine Änderung in der Zytokinexpression, sondern eher auf eine Hemmung der Zellproliferation zurückzuführen. Je mehr in zukünftigen Studien über die komplexe Pathologie der atopischen Dermatitis und die Einflüsse auf die verschiedenen Patienten erforscht wird, desto eher kann eine neue Hypothese über die Wirkmechanismen der essentiellen Fettsäuren gestellt und über weiterführende Studien nachgewiesen werden.

## VI Zusammenfassung

### Melanie Stehle

#### **Wirkung essentieller Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren mononukleären Zellen und Expression von Zytokinen bei Hunden mit atopischer Dermatitis**

Essentielle Fettsäuren werden seit 1987 zur symptomatischen Therapie bei caniner atopischer Dermatitis eingesetzt. Über 40 % der Hunde zeigen klinische Verbesserungen nach einer Fettsäuren-Supplementierung, 10 - 20 % der Hunde entwickeln eine vollständige Remission. Die komplexe, weitumfassende Pathogenese der Atopie ist zum momentanen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt, bietet aber die Basis, um Wirkmechanismen der essentiellen Fettsäuren aufzuschlüsseln.

Ziel dieser Studie war die Wirkung von essentiellen Fettsäuren auf die Proliferation von peripheren mononukleären Zellen zu erforschen. Zusätzlich wurden Primer für IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  etabliert, und die Wirkung von essentiellen Fettsäuren auf die Expression von IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  bei Hunden mit atopischer Dermatitis überprüft.

Für die Studie wurde Blut von 21 Hunden mit atopischer Dermatitis aus der *Vena jugularis* entnommen. Als Kontrollgruppe dienten 21 gesunde Hunde. Über eine Ficoll<sup>®</sup>-Präparation wurden periphere mononukleäre Zellen isoliert. Leukozyten von elf atopischen und elf gesunden Hunden wurden für den Proliferationsversuch verwendet. Die mononukleären Zellen wurden mit Allergen, Concanavalin A und fünf verschiedenen essentiellen Fettsäuren/-Kombinationen für 72 Stunden inkubiert. Unbehandelte mononukleäre Zellen dienten als Negativkontrolle. 18 Stunden vor Ende der Inkubation wurden die Zellsuspensionen mit <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und die Proliferation im Beta-Counter gemessen.

Gesunde Hunde zeigten bei Anwesenheit von Concanavalin A eine graduelle Reduktion der Proliferationsindices bei einer Inkubation der peripheren Blutleukozyten mit LA, GLA, ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA. Der Proliferationsindex war im Vergleich zur Negativkontrolle statistisch signifikant bei ALA, EPA/DHA ( $P < 0.05$ ) und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.05$ ). Eine Reduktion der PBL-Proliferation konnte bei gesunden Hunden in Anwesenheit von Allergen gesehen werden. Alle Fettsäuren mit Ausnahme der LA ( $P < 0.05$ ) lösten eine Inhibierung der Proliferation aus (GLA, ALA, EPA/DHA und GLA/EPA/DHA,  $P < 0.001$ ). Bei allergischen Hunden konnte eine ähnliche Reduktion nur in der Anwesenheit von Allergen ausgelöst werden. Diese Reduktion war statistisch signifikant nach einer Inkubation mit ALA ( $P < 0.001$ ), EPA/DHA ( $P < 0.01$ ) und GLA/EPA/DHA ( $P < 0.01$ ). Die vorliegende Studie ergab eine bessere Wirkung von EPA/DHA als für LA. In dieser Studie konnten mit Conca-

navalin A und verschiedenen essentiellen Fettsäuren inkubierte periphere Blutleukozyten atopischer Hunde in ihrer Proliferation nicht gesenkt werden. Eine Begründung für dieses Phänomen ist die bereits bestehende Aktivierung der T-Zellen auf Grund der bestehenden Erkrankung. Eine zusätzliche starke Stimulation durch Concanavalin A ist höchstwahrscheinlich zu mächtig für eine signifikante Suppression durch Fettsäuren.

Im zweiten Teil der Studie wurden hochspezifische Primer für IL-4, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  etabliert. Die Etablierung erfolgte über Blastsearch- und Primer-Express-Programme. Die Spezifität der Primer wurde über Agarosegelelektrophoresen und Standardkurven evaluiert. Periphere Blutleukozyten wurden mit Allergenen und verschiedenen essentiellen Fettsäuren für sechs Stunden inkubiert. Aus PBLs wurde RNA isoliert und die Qualität im Bioanalyzer überprüft. Um genomische DNA Kontaminierung zu vermeiden und RNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transkription Kit verwendet. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte mittels qPCR und dem Farbstoff SYBR Green.

Bei Hunden mit atopischer Dermatitis konnte eine signifikante Zunahme der Expression von IFN- $\gamma$  und IL-4 nach Zugabe von Allergenen beobachtet werden. Die deutlichste Zunahme konnte bei der Stimulation der PBLs mit Allergenen und GLA/EPA/DHA und EPA/DHA ( $P < 0.001$ ) gemessen werden. Auch bei gesunden Hunden konnten durch die Zugabe von Allergenen statistisch signifikante Veränderungen der IFN- $\gamma$ -Expression nachgewiesen werden. Essentielle Fettsäuren konnten diese Zunahme aber nicht hemmen.

Durch die Supplementierung von EPA/DHA konnte die Expression von TGF- $\beta$  bei gesunden Hunden signifikant gesenkt werden ( $P < 0.001$ ). Die anderen essentiellen Fettsäuren (LA, GLA/EPA/DHA) hatten weder bei gesunden noch bei atopischen Hunden einen signifikanten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta$ .

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass essentielle Fettsäuren und Allergene (*D.farinae*) die Zytokinexpression verändern können, allerdings konnte keine statistische Signifikanz zwischen den Zytokinexpressionen der einzelnen Zytokine im Vergleich zwischen gesunden und atopischen Hunden nachgewiesen werden. T-Zellen atopischer Hunde sind durch eine Inkubation mit essentiellen Fettsäuren in gleicher Weise stimulierbar wie T-Zellen gesunder Hunde.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass essentielle Fettsäuren die Proliferation von peripheren Blutleukozyten beeinflussen können.



## VII Summary

### Melanie Stehle

#### **The influence of polyunsaturated fatty acids on the response of PBMC proliferation and expression of cytokines in canine atopic dermatitis**

Essential fatty acids are used as symptomatic therapy in canine atopic dermatitis since 1987. In a double blinded, placebo-controlled randomized study, 10-20 % of atopic dogs were in complete remission and 40 % were significantly better after supplementation with PUFA (Mueller et al., 2005a). The pathogenesis of atopy is not completely known but offers clues to investigate the mechanisms of action of fatty acid supplementation.

The aim of this study was to evaluate the influence of essential fatty acids on the proliferation of peripheral mononuclear blood cells, establish specific primers for PCR and evaluate the influence of essential fatty acids on the cytokine expression of IL-4, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ .

For this study blood was collected from the jugular vein of 21 atopic and 21 normal dogs and PBMCs were isolated by Ficoll<sup>®</sup> preparation. For proliferation assays PBMCs were stimulated without and with various fatty acids. The fatty acids included LA, GLA, ALA, EPA/DHA and GLA/EPA/DHA. PBMCs were incubated without additional antigen, with antigen (*D. farinae*) or concanavalin A. The plates were incubated at 37° C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> for three days. <sup>3</sup>H-thymidin was added 18 hours before the end of the assay to each well. The plates were harvested using an automated system and counted. The proliferation of triplicates was calculated as proliferation index. The results of the proliferation assays show, that PBMCs of healthy dogs had a gradual reduction in the proliferation index in presence of concanavalin A from incubation without PUFA to incubation with LA, GLA, ALA, EPA/DHA and GLA/EPA/DHA respectively. This difference was statistically significant between control and ALA, EPA/DHA or GLA/EPA/DHA respectively (P < 0.05). A similar reduction was seen in the presence of allergen where all PUFA but LA led to a significant reduction of proliferation (P < 0.001). According to these results, n-3 PUFA are more effectively inhibiting PBMCs proliferation than n-6 PUFA. In contrast, the allergic patients showed a similar reduction only in the presence of allergen. When PBMCs were stimulated with concanavalin A, PUFA were not able to decrease proliferation with atopic patients. In these patients, allergen-specific T cells are already activated by the disease process and it is possible that additional strong stimulation with concanavalin A proved too powerful to be suppressed by fatty acids.

In the second part of the study, PBMCs of ten atopic dogs and ten healthy dogs were isolated as described above. A preliminary study showed the highest cytokine expression after stimulation for six hours compared to the results of expression after ten and 18 hours. After stimulation Trifast<sup>®</sup> was added, RNA prepared and RNA integrity was checked using a bioanalyzer. In order to avoid genomic DNA contamination and to transcribe RNA in cDNA the QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transkription Kit was used. Quantification for cytokines was performed by qPCR using SYBR<sup>®</sup> green. For each cytokine, specific primer pairs were synthesized based on the available cytokine sequences. The primer pairs were evaluated by a BLAST search and were quality checked by amplification of test cDNA and the products were evaluated by agarose gel electrophoresis and sequenced to finally verify the correct amplification product. To estimate the practicability of the primerpairs in the qPCR a standard curve was performed using Log<sub>10</sub> dilution series over seven magnitudes in combination with a dissociation curve analysis.

If we compared the cytokine expression to the negative control, there was a marked upregulation of IL-4 and IFN- $\gamma$  in normal and atopic dogs, when the PBMC were incubated with allergen. Allergen-induced upregulation was not reversed by incubation with PUFA. TGF- $\beta$  expression was not significantly altered in atopic dogs, but it was downregulated in healthy dogs under the influence of EPA/DHA. Based on the results of this study, *Dermatophagoides farinae* extract will lead to upregulation of IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA, but PUFA do not influence gene transcription of IL-4, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells of the dog.

Incubation of PBMC with PUFA had no statistically influence on the expression of IL-4, IFN- $\gamma$  or TGF- $\beta$ . In summary this study showed an influence of PUFA on PBMC proliferation in the canine which may contribute to the clinical effects of PUFA supplementation.

## VIII Literaturverzeichnis

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998 Apr 25;351(9111):1225-32.

Abba C, Mussa PP, Vercelli A, Raviri G. Essential fatty acids supplementation in different-stage atopic dogs fed on a controlled diet. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2005 Apr-Jun;89(3-6):203-7.

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.

Abraham W, Wertz PW, Downing DT. Linoleate-rich acylglucosylceramides of pig epidermis: structure determination by proton magnetic resonance. *Journal of lipid research*. 1985 Jun;26(6):761-6.

Aihara Y, Kasuya H, Onda H, Hori T, Takeda J. Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2001 Jan;32(1):212-7.

Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005 Nov;116(5):961-8; quiz 9.

Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Sep 19;202(6):829-39.

Alam SQ, Alam BS, Ren YF. Adenylate cyclase activity, membrane fluidity and fatty acid composition of rat heart in essential fatty acid deficiency. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1987 May;19(5):465-75.

Alam SQ, Ren YF, Alam BS. Effect of dietary trans fatty acids on some membrane-associated enzymes and receptors in rat heart. *Lipids*. 1989 Jan;24(1):39-44.

Anderson IE, Reid HW, Nettleton PF, McInnes CJ, Haig DM. Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon-gamma mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001 Dec;83(3-4):161-76.

Arikawa J, Ishibashi M, Kawashima M, Takagi Y, Ichikawa Y, Imokawa G. Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *The Journal of investigative dermatology*. 2002 Aug;119(2):433-9.

Bang HO, Dyerberg J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. *Acta medica Scandinavica*. 1972 Jul-Aug;192(1-2):85-94.

Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta medica Scandinavica*. 1976;200(1-2):69-73.

Barclay W, Abril R, Abril P, Weaver C, Ashford A. Production of docosahexaenoic acid from microalgae and its benefits for use in animal feeds. *World review of nutrition and dietetics*. 1998;83:61-76.

Bauer JE, Markwell PJ, Rawlings JM, Senior DE. Effects of dietary fat and polyunsaturated fatty acids in dogs with naturally developing chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1999 Dec 1;215(11):1588-91.

Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 1996 Jun 13;334(24):1557-60.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.

Biagi PL, Bordoni A, Masi M, Ricci G, Fanelli C, Patrizi A, et al. A long-term study on the use of evening primrose oil (Efamol) in atopic children. *Drugs under experimental and clinical research*. 1988;14(4):285-90.

Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology*. 1998 Aug 7;129(1):55-61.

Bjorneboe A, Soyland E, Bjorneboe GE, Rajka G, Drevon CA. Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*. 1987 Oct;117(4):463-9.

Bloj B, Morero RD, Farias RN, Trucco RE. Membrane lipid fatty acids and regulation of membrane-bound enzymes. Allosteric behaviour of erythrocyte Mg<sup>2+</sup>-ATPase, (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase and acetylcholinesterase from rats fed different fat-supplemented diets. *Biochimica et biophysica acta*. 1973 Jun 7;311(1):67-79.

Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a question of balance. *Archives of dermatology*. 1998 Jul;134(7):870-1.

Bond R, Lloyd DH. A double-blind comparison of olive oil and a combination of evening primrose oil and fish oil in the management of canine atopy. *The Veterinary record*. 1992 Dec 12;131(24):558-60.

Bond R, Lloyd DH. Combined treatment with concentrated essential fatty acids and prednisolone in the management of canine atopy. *The Veterinary record*. 1994 Jan 8;134(2):30-2.

Bond RL, D.H. Randomized singleblind comparison of an evening primrose oil and fish oil combination and concentrates of these oils in the management of canine atopy. *Veterinary dermatology*. 1992;3:215-9.

Bowser PA, Nugteren DH, White RJ, Houtsmuller UM, Prottey C. Identification, isolation and characterization of epidermal lipids containing linoleic acid. *Biochimica et biophysica acta*. 1985 May 17;834(3):419-28.

Brenner RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Progress in lipid research*. 1981;20:41-7.

Brivio-Haugland RP, Louis SL, Musch K, Waldeck N, Williams MA. Liver plasma membranes from essential fatty acid-deficient rats. Isolation, fatty acid composition, and activities of 5'-nucleotidase, ATPase and adenylate cyclase. *Biochimica et biophysica acta*. 1976 Apr 16;433(1):150-63.

Brown SA, Brown CA, Crowell WA, Barsanti JA, Kang CW, Allen T, et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2000 Mar;135(3):275-86.

Bryne KP, Campbell, K. L., Davis, C. A., Schaeffer, D. J. & Troutt, H. F. The effects of dietary n-3 vs n-6 fatty acids on ex-vivo LTB4 generation by canine neutrophils. *Veterinary dermatology*. 2000;11:9.

Burdge GC, Dunn RL, Wootton SA, Jackson AA. Effect of reduced dietary protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentrations in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *The British journal of nutrition*. 2002 Oct;88(4):379-87.

Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *The British journal of nutrition*. 2002 Oct;88(4):411-20.

Burgess GM, Godfrey PP, McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW, Jr. The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature*. 1984 May 3-9;309(5963):63-6.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000 Oct;25(2):169-93.

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr Res*. 2001a;21:309-41.

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 2001b Sep;36(9):1007-24.

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Jun;83(6 Suppl):1505S-19S.

Calder PC, Zurier RB. Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2001 Mar;4(2):115-21.

Camp RD. Prostaglandins, hydroxy fatty acids, leukotrienes and inflammation of the skin. *Clinical and experimental dermatology*. 1982 Jul;7(4):435-44.

Campbell KL. Fatty acid supplementation and skin disease. *The Veterinary clinics of North America*. 1990 Nov;20(6):1475-86.

Carucci JA, Washenik K, Weinstein A, Shupack J, Cohen DE. The leukotriene antagonist zafirlukast as a therapeutic agent for atopic dermatitis. *Archives of dermatology*. 1998 Jul;134(7):785-6.

Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *The American journal of clinical nutrition*. 1996 Jan;63(1):116-22.

Chamberlain KW. Atopic (allergic) dermatitis. *Vet Clin North Am*. 1974 Feb;4(1):29-39.

Chamizo C, Rubio JM, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by [correction of zby] a single tube RT-PCR. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001 Dec;83(3-4):191-202.

Chandra RK. Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. *Immunology*. 1989 Jun;67(2):141-7.

Chang KJ, Saito H, Tamura Y, Watanabe K, Yoshida S. Effect of oral ingestion of eicosapentaenoic acid-ethyl ester on natural killer cell activity in rat spleen cells. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 1989 Jul;37(1):31-5.

Collins RA, Howard CJ, Duggan SE, Werling D. Bovine interleukin-12 and modulation of IFN-gamma production. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1999 May;68(2-4):193-207.

Cookson W. The genetics of atopy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1994 Sep;94(3 Pt 2):643-4.

Cookson WO. Genetic aspects of atopic allergy. *Allergy*. 1998;53(45 Suppl):9-14.

Cox HE, Moffatt MF, Faux JA, Walley AJ, Coleman R, Trembath RC, et al. Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *The British journal of dermatology*. 1998 Jan;138(1):182-7.

Crawford MA. Background to essential fatty acids and their prostanoid derivatives. *British medical bulletin*. 1983 Jul;39(3):210-3.

Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981 Jun;78(6):3887-91.

Day MJ. Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal Langerhans cells and keratinocytes in canine dermatological disease. *Journal of comparative pathology*. 1996 Nov;115(4):317-26.

de Mari K, Maynard L, Eun HM, Lebreux B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *The Veterinary record*. 2003 Jan 25;152(4):105-8.

DeBoer DJ. Survey of intradermal skin testing practices in North America. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1989 Nov 15;195(10):1357-63.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001 Sep 20;81(3-4):271-6.

Deichmann KA, Heinzmann A, Forster J, Dischinger S, Mehl C, Brueggenolte E, et al. Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene. *Clin Exp Allergy*. 1998 Feb;28(2):151-5.

Di Marco R, Khademi M, Wallstrom E, Iacobaeus E, Salvaggio A, Caracappa S, et al. Curative effects of recombinant human Interleukin-6 in DA rats with protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2001 Jun 1;116(2):168-77.

Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *The New England journal of medicine*. 1985 Jan 31;312(5):283-9.

Elias PM, Brown BE. The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function is essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1978 Dec;39(6):574-83.

Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *The New England journal of medicine*. 1989 Feb 2;320(5):265-71.

Engelhard VH, Esko JD, Storm DR, Glaser M. Modification of adenylate cyclase activity in LM cells by manipulation of the membrane phospholipid composition in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976 Dec;73(12):4482-6.

Fan YY, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6151-60.

Fiocchi A, Sala M, Signoroni P, Banderali G, Agostoni C, Riva E. The efficacy and safety of gamma-linolenic acid in the treatment of infantile atopic dermatitis. *The Journal of international medical research*. 1994 Jan-Feb;22(1):24-32.

Forrest S, Dunn K, Elliott K, Fitzpatrick E, Fullerton J, McCarthy M, et al. Identifying genes predisposing to atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999 Nov;104(5):1066-70.

Forster S, Ilderton E, Norris JF, Summerly R, Yardley HJ. Characterization and activity of phospholipase A2 in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *The British journal of dermatology*. 1985 Feb;112(2):135-47.

Friedman Z. Essential fatty acids revisited. *American journal of diseases of children* (1960). 1980 Apr;134(4):397-408.

Fuhrmann H, Zimmermann A, Guck T, Oechtering G. Erythrocyte and plasma fatty acid patterns in dogs with atopic dermatitis and healthy dogs in the same household. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2006 Jul;70(3):191-6.

Fuller L, Carreno M, Esquenazi V, Zucker K, Zheng S, Roth D, et al. Characterization of anti-canine cytokine monoclonal antibodies specific for IFN-gamma: effect of anti-IFN-gamma on renal transplant rejection. *Tissue antigens*. 1994 Mar;43(3):163-9.

Gallai V, Sarchielli P, Trequatrini A, Franceschini M, Floridi A, Firenze C, et al. Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of neuroimmunology*. 1995 Feb;56(2):143-53.

Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Current opinion in immunology*. 1991 Dec;3(6):865-72.

Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 1995 Nov;1(7):795-805.

Gimenez-Arnau A, Barranco C, Alberola M, Wale C, Serrano S, Buchanan MR, et al. Effects of linoleic acid supplements on atopic dermatitis. *Advances in experimental medicine and biology*. 1997;433:285-9.

Glos K. The evaluation of commercially available veterinary diets recommended for dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*. 2007;18

Gray GM, White RJ, Majer JR. 1-(3'-O-acyl)-beta-glucosyl-N-dihydroxypentatriacontadienoylsphingosine, a major component of the glucosylceramides of pig and human epidermis. *Biochimica et biophysica acta*. 1978 Jan 27;528(1):127-37.

Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet*. 1994 Jan 1;343(8888):25-6.

Griffin CE. Atopic disease. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 1991 Nov;6(4):290-5.

Griffin CE. Canine atopic disease. In: Griffin, C.E., Kwochka, K.W., Mac-Donald, J.M., editors. *Current Veterinary Dermatology* St Louis: Mosby. 1993:99-120.

Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, et al. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. *The American journal of clinical nutrition*. 2002 Aug;76(2):454-9.



Grone A, Alldinger S, Baumgartner W. Interleukin-1beta, -6, -12 and tumor necrosis factor-alpha expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *Journal of neuroimmunology*. 2000 Oct 2;110(1-2):20-30.

Grone A, Fonfara S, Baumgartner W. Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. *Viral immunology*. 2002;15(3):493-505.

Grone A, Frisk AL, Baumgartner W. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1998 Sep 16;65(1):11-27.

Gruber DF, D'Alesandro MM, Walden TL, Jr. In vitro effects of leukotriene B4 (LTB4) on canine PMN effector function(s). *Agents and actions*. 1989 Nov;28(3-4):256-63.

Gu JY, Wakizono Y, Tsujita A, Lim BO, Nonaka M, Yamada K, et al. Effects of sesamin and alpha-tocopherol, individually or in combination, on the polyunsaturated fatty acid metabolism, chemical mediator production, and immunoglobulin levels in Sprague-Dawley rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1995 Dec;59(12):2198-202.

Hagel I, Lynch NR, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Rojas E. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite immunology*. 1993a Jun;15(6):311-5.

Hagel I, Lynch NR, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Rojas E. Relationship between the degree of poverty and the IgE response to *Ascaris* infection in slum children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993b Jan-Feb;87(1):16-8.

Hall JA, Wander RC, Gradin JL, Du SH, Jewell DE. Effect of dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs. *American journal of veterinary research*. 1999 Mar;60(3):319-27.

Halliwell RE. Atopic disease in the dog. *The Veterinary record*. 1971 Aug 21;89(8):209-14.

Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Aug;94(2):870-6.

Hansen HS, Jensen B. Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinic acid and alpha-linolenate. *Biochimica et biophysica acta*. 1985 May 17;834(3):357-63.

Harvey RG. Effect of varying proportions of evening primrose oil and fish oil on cats with crusting dermatosis ('miliary dermatitis'). *The Veterinary record*. 1993 Aug 28;133(9):208-11.

Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, et al. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *Journal of veterinary medicine*. 2002 Feb;49(1):27-31.

Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids*. 2000 Jul;35(7):763-8.

Helfand SC, Dickerson EB, Munson KL, Padilla ML. GD3 ganglioside antibody augments tumoricidal capacity of canine blood mononuclear cells by induction of interleukin 12. *Cancer research*. 1999 Jul 1;59(13):3119-27.

Henz BM, Jablonska S, van de Kerkhof PC, Stingl G, Blaszczyk M, Vandervalk PG, et al. Double-blind, multicentre analysis of the efficacy of borage oil in patients with atopic eczema. *The British journal of dermatology*. 1999 Apr;140(4):685-8.

Holt PG, Macaubas C, Cooper D, Nelson DJ, McWilliam AS. Th-1/Th-2 switch regulation in immune responses to inhaled antigens. Role of dendritic cells in the aetiology of allergic respiratory disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 1997;417:301-6.

Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006 Jul;118(1):178-89.

Horii T, Satouchi K, Kobayashi Y, Saito K, Watanabe S, Yoshida Y, et al. Effect of dietary alpha-linolenate on platelet-activating factor production in rat peritoneal polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1991 Sep 1;147(5):1607-13.

Horrobin DF. Essential fatty acids in clinical dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1989 Jun;20(6):1045-53.

Hou SY, Mitra AK, White SH, Menon GK, Ghadially R, Elias PM. Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction. *The Journal of investigative dermatology*. 1991 Feb;96(2):215-23.

Huang YS, Watanabe Y, Horrobin DF, Simmons V. The effects of dietary protein and cholesterol on tissue cholesterol contents and N-6 fatty acid compositions in rats and mice fed a gamma-linolenate-rich diet. *Monographs on atherosclerosis*. 1990;16:11-25.

Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *The American journal of clinical nutrition*. 1996 Feb;63(2):267-72.

Hwang D. Essential fatty acids and immune response. *Faseb J*. 1989 Jul;3(9):2052-61.

Hwang D. Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annual review of nutrition*. 2000;20:431-56.

Ishiwata K, Minagawa T, Kajimoto T. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 1998 Aug;60(8):911-7.

Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, et al. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyano-bacterial desaturase. *Nature biotechnology*. 1996 Aug;14(8):1003-6.

Isseroff RR. Fish again for dinner! The role of fish and other dietary oils in the therapy of skin disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1988 Dec;19(6):1073-80.

Jungi TW. Einführung in die Immunbiologie für Studierende der Veterinärmedizin. Aus dem Institut für Veterinär-Virologie der Universität Bern, [http://www.cx.unibe.ch/ivv/immunol/Deutsch/Scripten/3\\_3\\_199.pdf](http://www.cx.unibe.ch/ivv/immunol/Deutsch/Scripten/3_3_199.pdf). 1999.

Kay J, Gawkrödger DJ, Mortimer MJ, Jaron AG. The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994 Jan;30(1):35-9.

Kelley DS, Branch LB, Love JE, Taylor PC, Rivera YM, Iacono JM. Dietary alpha-linolenic acid and immunocompetence in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 1991 Jan;53(1):40-6.

Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*. 1999 Apr;34(4):317-24.

Kelly FJ. The metabolic role of n-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to human disease. *Comp Biochem Physiol A*. 1991;98(3-4):581-5.

Kew S, Banerjee T, Minihane AM, Finnegan YE, Muggli R, Albers R, et al. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *The American journal of clinical nutrition*. 2003 May;77(5):1287-95.

Kinsella JE, Bruckner G, Mai J, Shimp J. Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. *The American journal of clinical nutrition*. 1981 Oct;34(10):2307-18.

Kipar A, Leutenegger, C.M., Hetzel, U., Akens, M.K., Mislin, C.N., Reinacher, M., Lutz, H. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001;78:305-15.

Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine*. 1997a Jun;9(6):416-26.

Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine*. 1997b Jun;9(6):427-36.

Koulis A, Robinson DS. The anti-inflammatory effects of interleukin-10 in allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 2000 Jun;30(6):747-50.

Krakauer T. Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF-kappaB. *Current drug targets*. 2004 Sep;3(3):317-24.

Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta medica Scandinavica*. 1980;208(5):401-6.

Landmann L. The epidermal permeability barrier. *Anatomy and embryology*. 1988;178(1):1-13.

Lechowski R, Sawosz E, Klucinski W. The effect of the addition of oil preparation with increased content of n-3 fatty acids on serum lipid profile and clinical condition of cats with miliary dermatitis. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin*. 1998 Sep;45(6-7):417-24.

Leopold-Temmler B. Klinische Anwendungsmöglichkeiten von Interferonen. *Der praktische Tierarzt*. 2002;83(10):874-9.

Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000 May;105(5):860-76.

Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2003 Jan 11;361(9352):151-60.

Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Mar;113(5):651-7.

Leutenegger CM, Alluwaimi AM, Smith WL, Perani L, Cullor JS. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2000 Dec 29;77(3-4):275-87.

Leutenegger CN, Mislin B, Sigrist M, U, Ehrenguber R, Hofmann-Lehmann H, Lutz. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary Immunol and Immunopathol*. 1999;71:291-305.

Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Oct 11;102(41):14795-800.

Lindskov R, Holmer G. Polyunsaturated fatty acids in plasma, red blood cells and mononuclear cell phospholipids of patients with atopic dermatitis. *Allergy*. 1992 Oct;47(5):517-21.

Logas DBK, G.A. Double-blinded crossover study with marine oil supplementation containing high-dose eicosapentaenoic acid for the treatment of canine pruritic skin disease. *Veterinary dermatology*. 1994;5:99-104.

Lund EK, Harvey LJ, Ladha S, Clark DC, Johnson IT. Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers. *Annals of nutrition & metabolism*. 1999a;43(5):290-300.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1999b May 1;214(9):1336-41.

Manku MS, Horrobin DF, Morse N, Kyte V, Jenkins K, Wright S, et al. Reduced levels of prostaglandin precursors in the blood of atopic patients: defective delta-6-desaturase function as a biochemical basis for atopy. *Prostaglandins, leukotrienes, and medicine*. 1982 Dec;9(6):615-28.

Markus S, Failing K, Baumgartner W. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *Journal of neuroimmunology*. 2002 Apr;125(1-2):30-41.

Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Atopy patch test reactions in high-IgE beagles to different sources and concentrations of house dust mites. *Veterinary dermatology*. 2005 Oct;16(5):308-14.

Marsh KA, Ruedisueli, F.L., Coe, S.L., Watson, T.D.G. Effects of zinc and linoleic acid supplementation on the skin and coat quality of dogs receiving a complete and balanced diet. *Veterinary dermatology*. 2000;1:277-84.

Martin V, Najbar W, Gueguen S, Grousson D, Eun HM, Lebreux B, et al. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary microbiology*. 2002 Oct 22;89(2-3):115-27.

Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Current opinion in immunology*. 1998 Dec;10(6):649-55.

Maynar M, Mahedero G, Maynar I, Maynar JI, Tuya IR, Caballero MJ. Menopause-induced changes in lipid fractions and total fatty acids in plasma. *Endocrine research*. 2001 Aug;27(3):357-65.

Mayser P, Mrowietz U, Arenberger P, Bartak P, Buchvald J, Christophers E, et al. Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1998 Apr;38(4):539-47.

McMurchie EJ, Patten GS, McLennan PL, Charnock JS, Nestel PJ. The influence of dietary lipid supplementation on cardiac beta-adrenergic receptor adenylate cyclase activity in the marmoset monkey. *Biochimica et biophysica acta*. 1988 Jan 22;937(2):347-58.

Metz G. Omega-3-Fettsäuren: eine Standortbestimmung zum Millenium. *Forum-Medizin-Verl-Ges*. 2000.

Meydani SN. Modulation of cytokine production by dietary polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1992 Jun;200(2):189-93.

Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, et al. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte prolifer-

eration: comparison between young and older women. *The Journal of nutrition*. 1991 Apr;121(4):547-55.

Meydani SN, Lichtenstein AH, Cornwall S, Meydani M, Goldin BR, Rasmussen H, et al. Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment. *The Journal of clinical investigation*. 1993 Jul;92(1):105-13.

Miles EA, Banerjee T, Dooper MM, M'Rabet L, Graus YM, Calder PC. The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *The British journal of nutrition*. 2004 Jun;91(6):893-903.

Mimouni V, Christiansen EN, Blond JP, Ulmann L, Poisson JP, Bezard J. Elongation and desaturation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver. Effect of clofibrate feeding. *Biochimica et biophysica acta*. 1991 Nov 27;1086(3):349-53.

Molvig J, Pociot F, Worsaae H, Wogensen LD, Baek L, Christensen P, et al. Dietary supplementation with omega-3-polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukin-1 beta content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scandinavian journal of immunology*. 1991 Oct;34(4):399-410.

Mooney MA, Vaughn DM, Reinhart GA, Powers RD, Wright JC, Hoffman CE, et al. Evaluation of the effects of omega-3 fatty acid-containing diets on the inflammatory stage of wound healing in dogs. *American journal of veterinary research*. 1998 Jul;59(7):859-63.

Morse PF, Horrobin DF, Manku MS, Stewart JC, Allen R, Littlewood S, et al. Meta-analysis of placebo-controlled studies of the efficacy of Epogam in the treatment of atopic eczema. Relationship between plasma essential fatty acid changes and clinical response. *The British journal of dermatology*. 1989 Jul;121(1):75-90.

Morson LA, Clandinin MT. Diets varying in linoleic and linolenic acid content alter liver plasma membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *The Journal of nutrition*. 1986 Dec;116(12):2355-62.

Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Australian veterinary journal*. 2000 Jun;78(6):392-9.

Mueller RS, Bettenay, S.V. Long-term immunotherapy in 146 dogs with atopic dermatitis--a retrospective study. *Australian Veterinary Practitioner*. 1996;26:128.

Mueller RS, Fettman MJ, Richardson K, Hansen RA, Miller A, Magowitz J, et al. Plasma and skin concentration of polyunsaturated fatty acids in dogs with atopic dermatitis before and after supplementation with n-3 fatty acids. *American Journal of Veterinary Research*. 2005a;66:868-73.

Mueller RS, Fettman MJ, Richardson K, Hansen RA, Miller A, Magowitz J, et al. Plasma and skin concentrations of polyunsaturated fatty acids before and after supplementa-

tion with n-3 fatty acids in dogs with atopic dermatitis. *American journal of veterinary research*. 2005b May;66(5):868-73.

Mueller RS, Fieseler KV, Fettman MJ, Zabel S, Rosychuk RA, Ogilvie GK, et al. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *The Journal of small animal practice*. 2004 Jun;45(6):293-7.

Muller GH, Kirk, R.W., Scott, D.W. *Small Animal Dermatology*. WB Saunders. 1989.

Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. *The Journal of nutritional biochemistry*. 1990 Feb;1(2):68-79.

Muse R, Griffin, C.E., Rosenkrantz, W.S. The prevalence of otic manifestations and otitis externa in allergic dogs. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology & American College of Veterinary Dermatology*. 1996;12:33.

Neelands PJ, Clandinin MT. Diet fat influences liver plasma-membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity. *The Biochemical journal*. 1983 Jun 15;212(3):573-83.

Nesbitt GH, Freeman LM, Hannah SS. Effect of n-3 fatty acid ratio and dose on clinical manifestations, plasma fatty acids and inflammatory mediators in dogs with pruritus. *Veterinary dermatology*. 2003 Apr;14(2):67-74.

Nesbitt GH, Kedan, G.S., Caciolo, P. Canine atopy, part I. Etiology and diagnosis. *Compendium of Continuing Education*. 1984(6):73.

Neumann C, Gutgesell C, Fliegert F, Bonifer R, Herrmann F. Comparative analysis of the frequency of house dust mite specific and nonspecific Th1 and Th2 cells in skin lesions and peripheral blood of patients with atopic dermatitis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 1996 Jul;74(7):401-6.

Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science (New York, NY)*. 1984 Sep 21;225(4668):1365-70.

Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003 Aug;112(2):252-62.

Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003a Dec;112(6 Suppl):S128-39.

Novak N, Kruse S, Kraft S, Geiger E, Kluken H, Fimmers R, et al. Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2002 Oct;119(4):870-5.

Novak N, Tepel C, Koch S, Brix K, Bieber T, Kraft S. Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *The Journal of clinical investigation*. 2003b Apr;111(7):1047-56.

Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberstock J, Kraft S, et al. FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004 May;113(5):949-57.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2002a May;32(5):789-95.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2002b Sep 10;87(3-4):379-84.

Ogilvie GK, Fettman MJ, Mallinckrodt CH, Walton JA, Hansen RA, Davenport DJ, et al. Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Cancer*. 2000 Apr 15;88(8):1916-28.

Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, Mifune T, Hosaki Y, Tsugeno H, et al. Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acids compared with n-6 fatty acids on bronchial asthma. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2000 Feb;39(2):107-11.

Okano F, Satoh M, Yamada K. Cloning and expression of the cDNA for canine interleukin-12. *J Interferon Cytokine Res*. 1997 Nov;17(11):713-8.

Okano F, Yamada K. Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line. *Anticancer research*. 2000 Sep-Oct;20(5B):3411-5.

Okuda Y, Sakoda S, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T. Enhancement of Th2 response in IL-6-deficient mice immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of neuroimmunology*. 2000 Jun 26;105(2):120-3.

Okudaira H, Mori A. Simple understanding and optimistic strategy for coping with atopic diseases. IL-5 central hypothesis on eosinophilic inflammation. *International archives of allergy and immunology*. 1998 Sep;117(1):11-9.

Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental dermatology*. 1999 Jun;8(3):204-11.

Olivry T, Deangelo KB, Dunston SM, Clarke KB, McCall CA. Patch testing of experimentally sensitized beagle dogs: development of a model for skin lesions of atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*. 2006 Apr;17(2):95-102.

Olivry T, Dunston SM, Murphy KM, Moore PF. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Veterinary dermatology*. 2001a Feb;12(1):49-58.

Olivry T, Dunston SM, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Peters E, et al. A randomized controlled trial of misoprostol monotherapy for canine atopic dermatitis: effects on



dermal cellularity and cutaneous tumour necrosis factor-alpha. *Veterinary dermatology*. 2003 Feb;14(1):37-46.

Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001 Sep 20;81(3-4):219-25.

Olivry T, Marsella R, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001b Sep 20;81(3-4):347-62.

Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of dermatological research*. 1996 Sep;288(10):579-85.

Olivry T, Mueller RS. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*. 2003 Jun;14(3):121-46.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *The American Journal of dermatopathology*. 1997 Oct;19(5):477-86.

Olivry T, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Davidson G, Sousa CA. Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Veterinary dermatology*. 2002 Apr;13(2):77-87.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001 Sep 20;81(3-4):317-22.

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*. 2002 Oct 10;347(15):1151-60.

Ozkaya E. Adult-onset atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005 Apr;52(4):579-82.

Palmblad J, Malmsten CL, Uden AM, Radmark O, Engstedt L, Samuelsson B. Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*. 1981 Sep;58(3):658-61.

Paradis M, Scott, D.W., Giroux, D. Further investigations on the use of nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory agents in the management of canine pruritus. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1991;27:44.

Pastore S, Mascia F, Giustizieri ML, Giannetti A, Girolomoni G. Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2000;48(6):497-504.

Paterson S. Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *The Journal of small animal practice*. 1995 Sep;36(9):389-94.

Pinelli E, van der Kaaij SY, Broeren CP, Ruitenbergh EJ, Rutten VP. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogenetics*. 1999a Jul;49(7-8):696-9.

Pinelli E, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenbergh EJ, Bernadina W, et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1999b Aug 2;69(2-4):121-6.

Prescott SL, Holt PG. Abnormalities in cord blood mononuclear cytokine production as a predictor of later atopic disease in childhood. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28(11):1313-6.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001a Mar;122(Pt 3):253-61.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 2001b May 1;183(9):1421-4.

Reedy LM, Miller, W.H., Jr. *Allergic Skin Diseases of Dogs and Cats*. WB Saunders. 1989.

Reedy LM, Miller, W.H., Jr., Willemsse, A. *Allergic Skin Diseases of dogs and cats*. Philadelphia: WBSaunders. 1997:37-41.

Richieri GV, Kleinfeld AM. Free fatty acids inhibit cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis of allogeneic target cells. *J Immunol*. 1990 Aug 15;145(4):1074-7.

Rippke F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *American journal of clinical dermatology*. 2004;5(4):217-23.

Rivers JP, Frankel TL. Essential fatty acid deficiency. *British medical bulletin*. 1981 Jan;37(1):59-64.

Romagnani S, Parronchi P, D'Elia MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, et al. An update on human Th1 and Th2 cells. *International archives of allergy and immunology*. 1997 May-Jul;113(1-3):153-6.

Rosser EJ, Jr. Diagnosis of food allergy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993 Jul 15;203(2):259-62.

Rossetti RG, Seiler CM, DeLuca P, Laposata M, Zurier RB. Oral administration of unsaturated fatty acids: effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation. *Journal of leukocyte biology*. 1997 Oct;62(4):438-43.

Rottman JB, Tompkins WA, Tompkins MB. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Veterinary pathology*. 1996 Mar;33(2):242-8.

Ruzicka T. Leukotrienes in atopic eczema. *Acta dermato-venereologica*. 1989;144:48-9.

Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA, Ring J. Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 1986 Feb;86(2):105-8.

Saevik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar A, Larsen S, et al. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*. 2004 Jun;15(3):137-45.

Saevik BK, Thoresen SI, Taugbol O. Fatty acid composition of serum lipids in atopic and healthy dogs. *Research in veterinary science*. 2002 Oct;73(2):153-8.

Salem N, Kim, H. Y. & Yergey, J. A. Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. In: A. P. Simopolous, R R. Kifer and R. E. Martin (Eds.) *Healthy effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Academic Press Inc, Orlando. 1986:263-318.

Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6480-6.

Santoli D, Zurier RB. Prostaglandin E precursor fatty acids inhibit human IL-2 production by a prostaglandin E-independent mechanism. *J Immunol*. 1989 Aug 15;143(4):1303-9.

Sassen LM, Lamers JM, Verdouw PD. Fish oil and the prevention and regression of atherosclerosis. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 1994 Apr;8(2):179-91.

Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003 Mar;48(3):352-8.

Scarff DH, Lloyd DH. Double blind, placebo-controlled, crossover study of evening primrose oil in the treatment of canine atopy. *The Veterinary record*. 1992 Aug 1;131(5):97-9.

Schafer L, Kragballe K. Supplementation with evening primrose oil in atopic dermatitis: effect on fatty acids in neutrophils and epidermis. *Lipids*. 1991 Jul;26(7):557-60.

Schafer T, Dockery D, Kramer U, Behrendt H, Ring J. Experiences with the severity scoring of atopic dermatitis in a population of German pre-school children. *The British journal of dermatology*. 1997 Oct;137(4):558-62.

Schaffer HK. Essential fatty acids and eicosanoids in cutaneous inflammation. *International journal of dermatology*. 1989 Jun;28(5):281-90.

Schalin-Karrila M, Mattila L, Jansen CT, Uotila P. Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema: effect on clinical status, plasma phospholipid fatty acids and circulating blood prostaglandins. *The British journal of dermatology*. 1987 Jul;117(1):11-9.

Schmid-Grendelmeier P, Simon D, Simon HU, Akdis CA, Wuthrich B. Epidemiology, clinical features, and immunology of the "intrinsic" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy*. 2001 Sep;56(9):841-9.

Scott DW. Observations on canine atopy. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1981;17:91-100.

Scott DW, Miller WH, Jr., Decker GA, Wellington JR. Comparison of the clinical efficacy of two commercial fatty acid supplements (EfaVet and DVM Derm Caps), evening primrose oil, and cold water marine fish oil in the management of allergic pruritus in dogs: a double-blinded study. *The Cornell veterinarian*. 1992 Jul;82(3):319-29.

Scott DW, Miller WH, Jr., Reinhart GA, Mohammed HO, Bagladi MS. Effect of an omega-3/omega-6 fatty acid-containing commercial lamb and rice diet on pruritus in atopic dogs: results of a single-blinded study. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 1997 Apr;61(2):145-53.

Scott DW, Miller, W.H., Griffin, C.E. *Small Animal Dermatology*. 6th ed. Philadelphia. WB Saunders. 2001.

Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). *The Canadian veterinary journal*. 1990 Dec;31(12):830-5.

Scott KV, White, S.D., Rosychuck, R.A.W. A retrospective study of hyposensitization in atopic dogs in a flea-scarce environment. In: Ihrke PJ, et al, editors. *Advances in Veterinary Dermatology II*. New York. Pergamon Press. 1993:79.

Senter DA, Scott DW, Miller WH, Jr. Treatment of canine atopic dermatitis with zafirlukast, a leukotriene-receptor antagonist: a single-blinded, placebo-controlled study. *The Canadian veterinary journal*. 2002 Mar;43(3):203-6.

Serrick C, La Franchesca S, Giaid A, Shennib H. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Jul;152(1):277-82.

Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2004 Nov;102(1-2):19-31.

Sierra A, Ferrer I, Arbizu T, Buendia E. [Multiple sclerosis: IL-2, IFN-tau and PGE2 secretion in mononuclear cell cultures stimulated with PHA and the effect of these cytokines on oligodendroglial cells]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 1992 Nov;7(9):247-53.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition*. 1991 Sep;54(3):438-63.

Simopoulos AP. Overview of evolutionary aspects of omega 3 fatty acids in the diet. *World review of nutrition and dietetics*. 1998;83:1-11.

Simopoulos AP. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 1999 May-Jun;60(5-6):421-9.

Simopoulos AP. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry science*. 2000 Jul;79(7):961-70.

Simopoulos AP, Kifer RR, Wykes AA. Omega 3 fatty acids: research advances and support in the field since June 1985 (worldwide). *World review of nutrition and dietetics*. 1991;66:51-71.

Sinclair HM. Essential fatty acids--an historical perspective. *Biochemical Society transactions*. 1990 Oct;18(5):756-61.

Sinke JD, Rutten VP, Willemse T. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2002 Sep 10;87(3-4):351-6.

Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of lipid research*. 1985 Sep;26(9):1015-35.

Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, Bhan AK, Geha RS. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Apr;103(8):1103-11.

Sprecher H. Biochemistry of essential fatty acids. *Progress in lipid research*. 1981;20:13-22.

Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature immunology*. 2004 Jun;5(6):575-81.

Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine*. 2007 Feb;13(2):139-45.

Stenius-Aarniala B, Aro A, Hakulinen A, Ahola I, Seppala E, Vapaatalo H. Evening primrose oil and fish oil are ineffective as supplementary treatment of bronchial asthma. *Annals of allergy*. 1989 Jun;62(6):534-7.

Stordeur P, Zhou L, Byl B, Brohet F, Burny W, de Groote D, et al. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *Journal of immunological methods*. 2003 May 1;276(1-2):69-77.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Erb HN, Harter L, Appel MJ. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. *Infection and immunity*. 1998 Jan;66(1):247-58.

Strom H, Thomsen MK. Effects of proinflammatory mediators on canine neutrophil chemotaxis and aggregation. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1990 Jul;25(3):209-17.

Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et biophysica acta*. 1984 Jan 27;779(1):89-137.

Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Inokuma H, Ohnishi T, Hayashiya S, et al. Evaluation of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2002 Jun;64(6):513-8.

Tato CM, O'Shea JJ. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature*. 2006 May 11;441(7090):166-8.

Taugbol O, Baddaky-Taugbol B, Saarem K. The fatty acid profile of subcutaneous fat and blood plasma in pruritic dogs and dogs without skin problems. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 1998 Oct;62(4):275-8.

Terencio MC, Ferrandiz ML, Posadas I, Roig E, de Rosa S, De Giulio A, et al. Suppression of leukotriene B4 and tumour necrosis factor alpha release in acute inflammatory responses by novel prenylated hydroquinone derivatives. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1998 May;357(5):565-72.

Tesoriere L, Bongiorno A, Livrea MA, Bono A. Modulation by docosahexaenoic acid of the epinephrine-stimulated adenylate cyclase activity of the bovine retina. *Journal of neurochemistry*. 1988 Sep;51(3):704-9.

Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichen DF, van Reijssen FC, Mudde GC, et al. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1996 Mar;97(3):828-37.

Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, et al. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids*. 2001a Nov;36(11):1183-93.

Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y. *The American journal of clinical nutrition*. 2001b Mar;73(3):539-48.

Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *The Journal of nutrition*. 2001c Jul;131(7):1918-27.

Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of dermatological science*. 2000 Dec;24 Suppl 1:S29-38.

Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4+ cells in human allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997 Jul;100(1):1-6.

van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1991 Sep;97(3):389-94.

van Reijsen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1992 Aug;90(2):184-93.

van Vliet T, Katan MB. Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish. *The American journal of clinical nutrition*. 1990 Jan;51(1):1-2.

Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, Williams HC, Robinson DA, Duff GW, et al. Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2004 Jul;123(1):62-6.

Vaughn DM, Reinhart, GA., Swaim, F. S., Lauten, S. D., Garner, C. A., Boudreax, M. K., Spano, J. S., Hofman, C. E. & Okuyama, H. Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene B synthesis in dog skin and neutrophils. *Veterinary dermatology*. 1994;5:11.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89.

Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, et al. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Oct;104(8):1097-105.

Virella G, Kilpatrick JM, Rugeles MT, Hyman B, Russell R. Depression of humoral responses and phagocytic functions in vivo and in vitro by fish oil and eicosapentanoic acid. *Clinical immunology and immunopathology*. 1989 Aug;52(2):257-70.

Vollset I. Atopic dermatitis in Norwegian dogs. *Nordisk veterinærmedicin*. 1985 Mar-Apr;37(2):97-106.

Waldvogel AS, Hediger-Weithaler BM, Eicher R, Zakher A, Zarlenga DS, Gasbarre LC, et al. Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2000 Dec 29;77(3-4):201-12.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *The British journal of nutrition*. 2003 May;89(5):679-89.

Wander RC, Hall JA, Gradin JL, Du SH, Jewell DE. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *The Journal of nutrition*. 1997 Jun;127(6):1198-205.

Warner JO. A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001 Dec;108(6):929-37.

Watanabe S, Sakai N, Yasui Y, Kimura Y, Kobayashi T, Mizutani T, et al. A high alpha-linolenate diet suppresses antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. *The Journal of nutrition*. 1994 Sep;124(9):1566-73.

Werfel T, Morita A, Grewe M, Renz H, Wahn U, Krutmann J, et al. Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 1996 Dec;107(6):871-6.

Wertz PW, Cox PS, Squier CA, Downing DT. Lipids of epidermis and keratinized and non-keratinized oral epithelia. *Comparative biochemistry and physiology*. 1986;83(3):529-31.

Wertz PW, Downing DT. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Science (New York, NY)*. 1982 Sep 24;217(4566):1261-2.

Wertz PW, Downing DT. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *Journal of lipid research*. 1983 Jun;24(6):759-65.

White SD. Food hypersensitivity in 30 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1986 Apr 1;188(7):695-8.

Whitley EM, Bird AC, Zucker KE, Wolfe LG. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer research*. 1995 May-Jun;15(3):923-9.

Wilhelm S. Untersuchungen zum Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf den Knochstoffwechsel der Katze. *Vet Med Diss, München* 2000.

Willemsse J, van Nieuwenhuizen O, Gooskens RH, Westenberg HG. Treatment of non-fluctuating progressive dystonia: a neuropharmacological approach. *Neuropediatrics*. 1984 Oct;15(4):208-10.

Williams HC, Strachan DP. The natural history of childhood eczema: observations from the British 1958 birth cohort study. *The British journal of dermatology*. 1998 Nov;139(5):834-9.

Wittich FW. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal - seasonal hay fever (fall type) in a dog. *Allergy*. 1941;12:247-51.

Wollenberg A, Bieber T. Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy*. 2000 Mar;55(3):205-13.



Wright S, Burton JL. Oral evening-primrose-seed oil improves atopic eczema. *Lancet*. 1982 Nov 20;2(8308):1120-2.

Xu H, Lichtstein D, Kassis S, Lutz RA, Rodbard D, Chernick SS. Multiple interactions of unsaturated fatty acids with opiate and ouabain binding sites and beta-adrenergic sensitive adenylate cyclase system. *Journal of receptor research*. 1988;8(1-4):205-23.

Yamazaki K, Fujikawa M, Hamazaki T, Yano S, Shono T. Comparison of the conversion rates of alpha-linolenic acid (18:3(n - 3)) and stearidonic acid (18:4(n - 3)) to longer polyunsaturated fatty acids in rats. *Biochimica et biophysica acta*. 1992 Jan 3;1123(1):18-26.

Yardley HJ, Summerly R. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacology & therapeutics*. 1981;13(2):357-83.

Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8183-90.

Ziboh VA. Implications of dietary oils and polyunsaturated fatty acids in the management of cutaneous disorders. *Archives of dermatology*. 1989 Feb;125(2):241-5.

Zollner N, Tato F. Fatty acid composition of the diet: impact on serum lipids and atherosclerosis. *The Clinical investigator*. 1992 Nov;70(11):968-1009.

## IX Anhang

### 9.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Übersicht bedeutender Omega-3- und Omega- 6-Fettsäuren

Tab. 4-1: Vergleich Leukozytengehalte einer gesunden achtjährigen Podenco-Mischlings-Hündin

Tab. 4-2: PBL-Gehalt nach Präparation PBLs

Tab. 4-3: Vergleich aufgetaute PBLs/frisch präparierte PBLs zum Zeitpunkt des Einsähens in das Kulturmedium und nach 72 Stunden Inkubation

Tab. 4-4: photometrische Messung RNA-Gehalt im Vergleich aufgetaute PBLs/frisch präparierte PBLs nach 72 Stunden Inkubation

Tab. 4-5: Veränderung der Expressionswerte von  $\beta$ -Aktin, IFN- $\gamma$ , IL-4 und TGF- $\beta$  nach 6 Stunden-, 10 Stunden- und 18 Stunden Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>

Tab. 4-6: Auflistung der verwendeten Primer

Tab. 4-7: Änderungen der Expression von IFN- $\gamma$  bei Hunden mit atopischer Dermatitis nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf die Kontrolle und auf das Allergen. P = 0.0002, post Test

Tab. 4-8: Änderungen der Expression von IFN- $\gamma$  von gesunden Hunden nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf Kontrolle (P = 0.0001) und Allergen (P = 0.0025), post Test

Tab. 4-9: Änderungen der Expression von IL-4 bei Hunden mit atopischer Dermatitis nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf Kontrolle (P = 0.0001) und Allergen (P = 0.0025), post Test

Tab. 4-10: Änderungen der Expression von IL-4 bei gesunden Hunden nach Stimulation mit Allergen und verschiedenen Fettsäuren. Normalisiert wurde auf Kontrolle (P = 0.0001) und Allergen (P = 0.0025), post Test

Tab. 4-11: Bei der Berechnung wurde der Friedman Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest, P = 0.3745 eingesetzt

Tab. 4-12: Darstellung der Expressionen von TGF- $\beta$  von gesunden Hunden, P = 0.0022

Tab. 4-13: Zytokinexpressionen im Vergleich zwischen Hunden mit atopischer Dermatitis und gesunden Hunden, Post Test

## 9.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Konversion der Omega-3/Omega-6-Fettsäuren in verschiedene Fettsäuren und entsprechenden Eicosanoiden. Eicosanoide werden aus den biologischen Vorstufen Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure synthetisiert

Abb. 2-2: Eicosanoidsynthese aus der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure

Abb. 2-3: Aufbau der Haut. An Membranoberflächen sind polare Anteile der Inositole, Serine, Ethanolamine, Choline und Glycophospholipide lokalisiert. Fettsäuren, Proteine und Cholesterole bilden das Gerüst zwischen den Membranoberflächen (modifiziert nach Wright, 1991).

Abb. 2-4: native T-Zellen werden durch APCs zur Differenzierung angeregt (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

Abb. 2-5: Langerhanszellen können epidermal penetrierende Antigene aufnehmen, zu peripheren Lymphknoten migrieren und Antigene den T-Zellen präsentieren. (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

Abb. 2-6: links: Dendritische Zellen sezernieren nach Antigenkontakt IL-12. Dies induziert die Synthese von IFN- $\gamma$  in natürlichen Killerzellen. Native CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch die Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  zur T<sub>H</sub>1-Zelldifferenzierung angeregt. Rechts: gleichzeitig werden durch Antigenkontakt IL-12 von Dendritischen Zellen sezerniert und eine Ausschüttung von IL-4 induziert. Native CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch die Anwesenheit von IL-4 zu T<sub>H</sub>2-Zellen aktiviert (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

Abb. 2-7: Aktivierte T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und induzieren eine verringerte Proliferation von T<sub>H</sub>2-Zellen (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

Abb. 2-8: Aktivierte regulatorische T-Zellen sezernieren TGF- $\beta$  und IL-10 und unterdrücken die Aktivität und das Wachstum von T<sub>H</sub>1-Zellen (modifiziert nach Janeway, 2005, 6. Auflage)

Abb. 3-1: Schichtung der verschiedenen Phasen nach Zentrifugation

Abb. 3-2: Links: elektrophoretische Darstellung der fluoreszierenden Einheiten (FU) aufgeschlüsselter Gesamt-RNA in 5s, 18s, 28s im zeitlichen Verlauf (s). Rechts: spezifische Banden für 5s, 18s, 28s auf einem Gel

Abb. 3-3: Graphische Darstellung von Gelbildern. Das erste Gel zeigt die Leiter mit ihren spezifischen Banden, während bei den Proben eins bis zwölf die 18s- und 28s-Banden dargestellt sind

Abb. 3-4: Amplifikationskurve am Beispiel einer Verdünnungsreihe

Abb. 3-5: Dissoziationskurve: Vervielfältigung eines spezifischen Amplifikates

Abb. 3-6.1: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von Interferon- $\gamma$ . Bei der Auswertung des Effizienzvergleichs wurde das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten  $R$  (Bestimmtheitsmass) und die Regressionsgerade zur Darstellung des linearen Zusammenhangs der Meßergebnisse berechnet.

Abb. 3-6.2: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von IL-4

Abb. 3-6.3: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von TGF- $\beta$

Abb. 3-6.4: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von  $\beta$ -Aktin

Abb. 3-6.1-5: Graphische Darstellung der Regressionsgeraden von 18s rRNA

Abb. 3-7: Wirkung eines interkalierenden Farbstoffs am Beispiel von SYBR Green

Abb. 3-8:  $C_t$ -Wert beschreibt den Zeitpunkt einer Messung, bei welchem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt

Abb. 4-1: Inhibierung der PBL-Proliferation gesunder Hunde nach Inkubation mit Concanavalin A und verschiedenen Fettsäuren

Abb. 4-2: Inhibierung der PBL-Proliferation gesunder Hunde nach Inkubation mit Allergen (*D.farinae*) und verschiedenen Fettsäuren

Abb. 4-3: Inhibierung der PBL-Proliferation atopischer Hunde nach Inkubation mit Allergen (*D.farinae*) und verschiedenen Fettsäuren

Abb. 4-4: Inhibierung der PBL-Proliferation atopischer Hunde nach Inkubation mit Concanavalin A und verschiedenen Fettsäuren

Abb. 4-5: Einzelne Banden mit einer Basenpaarlänge von 100-150 bp deuten auf spezifische Amplifikate von IL-4, IFN- $\gamma$ , und 18S rRNA (Beschriftung von links nach rechts) hin. Darstellung des 50bp-Markers im linken und rechten Bildbereich. Bei TGF- $\beta$  (rechts) ist ein zweites Amplifikat mit einer Länge von 50 bp sichtbar

Abb. 4-6: Agarosegelelektrophorese mit RNA. Die dargestellten Banden sind im Bereich von 18s und 28s ausgebildet

Abb. 4-7: Bestimmung des  $\Delta C_t$ -Wertes

Abb. 4-8: PBLs der Atopiker wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IFN- $\gamma$  gemessen

Abb. 4-9: PBLs der Kontrollgruppe wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IFN- $\gamma$  gemessen

Abb. 4-10: PBLs von Atopikern wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IL-4 gemessen

Abb. 4-11: PBLs der Kontrollgruppe wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von IL-4 gemessen

Abb. 4-12: PBLs von Atopikern wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von TGF- $\beta$  gemessen

Abb. 4-13: PBLs von gesunden Hunden wurden als Negativkontrolle, mit Allergen, Allergen und LA, EPA/DHA oder GLA/EPA/DHA in der qPCR eingesetzt und die Expression von TGF- $\beta$  gemessen

### 9.3. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

**Heparin-Natrium Braun 25 000 I.E./5ml**, Braun, Melsungen

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

8,0 g	Natriumchlorid (NaCl), AppliChem GmbH, Darmstadt
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ), AppliChem GmbH, Darmstadt
0,2 g	Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), AppliChem GmbH, Darmstadt
0,2 g	Kaliumchlorid (KCl), AppliChem GmbH, Darmstadt

1 x PBS: ad 1000 ml Aqua dest.

10 x PBS: ad 100 ml Aqua dest.

auf pH 7,2 eingestellt, für den Gebrauch in der Zellkultur autoklavieren, bei 4° C aufbewahren.

**Ficoll®-Lösung**, Bicol Separating Solution, Bichrom AG, Berlin

**Trypanblau**, Biochrom AG, Berlin

#### **Standardmedium (10 % Fetales Kälber Serum,FCS)**

445 ml RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin

50 ml FCS, Biochrom AG, Berlin

5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), Biochrom AG, Berlin

#### **Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO)**

9,0 ml FCS

1,0 ml Dimethylsulfoxid (*DMSO*), AppliChem GmbH, Darmstadt

bei -20° C aufbewahrt

**Stammlösung Concanavalin A (Con A), Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg**

15 mg Concanavalin A

ad 10 ml RPMI 1640, in Aliquots von 100 µl bei -20° C gelagert, nach Auftauen Rest verwenden.

**Stammlösung Phytinhaemagglutinin (PHA), SIGMA-Aldrich, Buchs**

**peqGOLD Trifast<sup>TM</sup>**, Erlangen bei 4° C aufbewahrt

**Chloroform**, AppliChem GmbH, Darmstadt

**Isopropanol**, AppliChem GmbH, Darmstadt

**96 % Ethanol, reinst**, AppliChem GmbH, Darmstadt

**75 % Ethanol,**

38 ml Ethanol reinst,

ad 50 ml RNase freies Wasser

**0,5 x TBE Puffer**, Invitrogen, Karlsruhe

54,0 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, AppliChem GmbH, Darmstadt

27,5 g Borsäure, Riedel-de Haen, Seelze

20,0 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), SIGMA-Aldrich, Buchs

ad 10 l Aqua dest., bei Raumtemperatur gelagert

**2 % Agarose**, peqGOLD Universal Agarose, peqLab Biotechnologie AG, Erlangen

1,4 g Agarose

70 ml 0,5 x TBE Puffer

vor Gebrauch angesetzt

**6 x Loading Dye Solution (Ladepuffer)**, SIGMA-Aldrich, Buchs, Schweiz

**GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Marker)**, Fermentas, Ontario, Kanada

**Stammlösung Ethidiumbromid**, Sigma, Deisenhofen

10 mg Ethidiumbromid

ad 1 ml Aqua dest., bei 4° C aufbewahrt.

Zum Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt.

**[<sup>3</sup>H]-Thymidin-Gebrauchslösung**, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

0,5 ml [<sup>3</sup>H]Thymidin (5 µCi/5 ml)

ad 10 ml RPMI 1640 3, bei 4°C aufbewahrt

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, AppliChem GmbH, Darmstadt

**Glass-fiber Filter**, Packard, Dreieich

**Szintillationsflüssigkeit**, Packard, Dreieich

**Fettsäuren:**

Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure 90%, Fa. SIGMA-Aldrich, Buchs

Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure min. 98%, Fa. SIGMA-Aldrich, Buchs

Gamma-Linolensäure min. 97%, Fa. SIGMA-Aldrich, Buchs

Alpha-Linolsäure min. 95%, Fa. SIGMA-Aldrich, Buchs

Linolensäure min. 97%, Fa. SIGMA-Aldrich, Buchs

**QuantiTect® SYBR Green PCR Kit**, Qiagen, Hilden

Bei -20° C in Aliquots a 2 ml gelagert

**Wasser für Molekularbiologie**, AppliChem GmbH, Darmstadt

**SDS-Desinfektionsflüssigkeit**, SDS granuliert, reinst, AppliChem GmbH, Darmstadt

10 %ige Lösung: 10 g SDS in 100 ml Aqua dest.



#### 9.4. Verbrauchsmaterialien

Butterflykanülen	Venofix <sup>®</sup>	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	10µl Gilson	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	20µl Gilson/Eppendorf	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	100µl Gilson/Eppendorf Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	200µl Gilson/Eppendorf Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	1000µl Gilson/Eppendorf Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
24-Loch-Platte	Nunclon <sup>™</sup> Surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Loch-Platte	Nunclon <sup>™</sup> Surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
10ml Pipette	Sarstedt Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
25ml Pipette	Sarstedt Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
50ml Tube (Falcon)	114 x 28mm	Sarstedt, Nümbrecht
Cryo Tube 1,8ml	1,8ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
20ml Spritze		Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
20G Kanüle	gelb	Microlance <sup>™</sup> 3, Fraga, Spanien
Reagiergefäß 1,5ml	Microtube 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5ml	Microtube 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Gentle Skin <sup>®</sup> grip	Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Nitril 3000	Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
MicroAmp <sup>®</sup> Optical 96 well	Reaktionplatte	Quiagen, Hilden
QuantiTect <sup>®</sup> Reagenz	cDNA-Synthese	Quiagen, Hilden
Agilent RNA 6000 Eukaryonten Nano Kit	Bioanalyzer Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

### 9.5. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller, Herkunft
Bioanalyzer	Agilent Technologies Company	Santa Clara, USA
Brutschrank	Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero Heraeus Instruments, Cell-Harvester Filtermate Harvester Instrument	Packard, Dreieich
Brutschrank	CO <sub>2</sub> Inkubator RS Biotech <sup>TM</sup> Galaxy®	Nunc, Wiesbaden
Computersystem	Gel Dokumentation Gel Doc 2000 Software: Quantity One	Bio-Rad, München
Flow	Flow Advanced Bio Safety Cabinet	Nunc, Wiesbaden
Flow	Flow Steril-Helios	Biohit, Mailand, Italien
Flow	Sterile Werkbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Luminescence Counter	Beta-Counter TopCount NXT Microplate Scintillation Luminescence Counter	Packard, Dreieich
Mikroskop	Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle	Mikrowelle Moulinex	Moulinex
Pipettierhilfe	Accu-jet <sup>®</sup> <i>pro</i>	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	2µl Gilson	Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	10µl Gilson	Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	20µl Gilson	Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	100µl Gilson	Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	200µl Gilson	Gilson, Frankreich

Pipettierhilfe	1000µl Gilson	Gilson, Frankreich
Photometer	Photometer Biophotometer Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Photometer Küvette	Photometer Küvette Spectrophotometer Quartz- Küvette	Sigma, Deisenhofen
Spannungsgerät	Power-Supply Power Pac 300	Bio Rad, München
Thermocycler	Thermocycler T3 Biometra	Biometra, Göttingen
UV-Strahlung zur Gelauswertung	UV-Crosslinker Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Waage Mettler, PC 400	Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz
Wasserbad	Wasserbad Koltermann Labortechnik	Koltermann, Labortechnik, Uetzenhäningsen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Beckman Coulter Model TJ-6 Zentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge	Beckman Coulter GS-6KK Zentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge	Zentrifuge Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

**9.6. Optische Dichte (OD) Messung am Photometer zur Errechnung der einzusetzenden RNA-/RNase freiem Wasser-Menge zur reversen Transkription:**

Patient	Inkubation mit	OD-Messung:		Konzentration:	benötigte Menge [µl]:	
		µg/ml	260/280	µg/µl	RNA	Wasser
A1	Kontrolle	3,6	1,59	0,36	1,11	10,89
A1	Allergen	5,5	1,24	0,55	0,73	11,27
A1	Allergen, 1. FS	5,7	1,54	0,57	0,70	11,30
A1	Allergen, 4. FS	5,1	1,64	0,51	0,78	11,22
A1	Allergen, 5. FS	6,2	1,58	0,62	0,65	11,35
A2	Kontrolle	3,8	1,6	0,38	1,05	10,95
A2	Allergen	4,7	1,63	0,47	0,85	11,15
A2	Allergen, 1. FS	8,5	1,55	0,85	0,47	11,53
A2	Allergen, 4. FS	6	1,53	0,6	0,67	11,33
A2	Allergen, 5. FS	9	1,55	0,9	0,44	11,56
A3	Kontrolle	4,4	1,49	0,44	0,91	11,09
A3	Allergen	3,4	1,5	0,34	1,18	10,82
A3	Allergen, 1. FS	7,8	1,51	0,78	0,51	11,49
A3	Allergen, 4. FS	4,9	1,47	0,49	0,82	11,18
A3	Allergen, 5. FS	3,7	1,55	0,37	1,08	10,92
A4	Kontrolle	4	1,54	0,4	1,00	11,00
A4	Allergen	2,7	1,56	0,27	1,48	10,52
A4	Allergen, 1. FS	1,7	1,55	0,17	2,35	9,65
A4	Allergen, 4. FS	1,2	1,54	0,12	3,33	8,67
A4	Allergen, 5. FS	3,8	1,52	0,38	1,05	10,95
A5	Kontrolle	7,6	1,55	0,76	0,53	11,47
A5	Allergen	7,9	1,58	0,79	0,51	11,49
A5	Allergen, 1. FS	8,3	1,55	0,83	0,48	11,52
A5	Allergen, 4. FS	16,9	1,56	1,69	0,24	11,76
A5	Allergen, 5. FS	6,9	1,54	0,69	0,58	11,42
A6	Kontrolle	4,4	1,62	0,44	0,91	11,09
A6	Allergen	4,9	1,58	0,49	0,82	11,18
A6	Allergen, 1. FS	4,6	1,6	0,46	0,87	11,13
A6	Allergen, 4. FS	5,1	1,57	0,51	0,78	11,22
A6	Allergen, 5. FS	6,9	1,59	0,69	0,58	11,42
A7	Kontrolle	5,3	1,58	0,53	0,75	11,25
A7	Allergen	3,8	1,57	0,38	1,05	10,95
A7	Allergen, 1. FS	3	1,56	0,3	1,33	10,67
A7	Allergen, 4. FS	2,5	1,58	0,25	1,60	10,40
A7	Allergen, 5. FS	2,2	1,59	0,22	1,82	10,18
A8	Kontrolle	2,6	1,64	0,26	1,54	10,46
A8	Allergen	10,2	1,1	1,02	0,39	11,61

Patient	Inkubation mit	OD-Messung:	Konzentration:	benötigte Menge [µl]:	benötigte Menge [µl]:	benötigte Menge [µl]:
		µg/ml	260/280	µg/µl	RNA	Wasser
A8	Allergen, 1. FS	2,7	1,6	0,27	1,48	10,52
A8	Allergen, 4. FS	2,6	1,62	0,26	1,54	10,46
A8	Allergen, 5. FS	2,1	1,61	0,21	1,90	10,10
A9	Kontrolle	10,7	1,56	1,07	0,37	11,63
A9	Allergen	6,5	1,63	0,65	0,62	11,38
A9	Allergen, 1. FS	5	1,64	0,5	0,80	11,20
A9	Allergen, 4. FS	4	1,56	0,4	1,00	11,00
A9	Allergen, 5. FS	5,6	1,54	0,56	0,71	11,29
A10	Kontrolle	6,6	1,51	0,66	0,61	11,39
A10	Allergen	4,9	1,48	0,49	0,82	11,18
A10	Allergen, 1. FS	5,6	1,52	0,56	0,71	11,29
A10	Allergen, 4. FS	4,8	1,55	0,48	0,83	11,17
A10	Allergen, 5. FS	0,9	1,77	0,09	4,44	7,56
N1	Kontrolle	5	1,68	0,5	0,80	11,20
N1	Allergen	11,1	1,58	1,11	0,36	11,64
N1	Allergen, 1. FS	8,5	1,56	0,85	0,47	11,53
N1	Allergen, 4. FS	7,6	1,6	0,76	0,53	11,47
N1	Allergen, 5. FS	4,4	1,73	0,44	0,91	11,09
N2	Kontrolle	3,2	1,54	0,32	1,25	10,75
N2	Allergen	2,4	1,54	0,24	1,67	10,33
N2	Allergen, 1. FS	1,3	1,6	0,13	3,08	8,92
N2	Allergen, 4. FS	5,1	1,5	0,51	0,78	11,22
N2	Allergen, 5. FS	2,1	1,54	0,21	1,90	10,10
N3	Kontrolle	6,7	1,56	0,67	0,60	11,40
N3	Allergen	3,9	1,56	0,39	1,03	10,97
N3	Allergen, 1. FS	4,6	1,53	0,46	0,87	11,13
N3	Allergen, 4. FS	4,8	1,53	0,48	0,83	11,17
N3	Allergen, 5. FS	7,2	1,53	0,72	0,56	11,44
N4	Kontrolle	4,3	1,59	0,43	0,93	11,07
N4	Allergen	1,7	1,56	0,17	2,35	9,65
N4	Allergen, 1. FS	4,1	1,57	0,41	0,98	11,02
N4	Allergen, 4. FS	5,6	1,57	0,56	0,71	11,29
N4	Allergen, 5. FS	2,2	1,6	0,22	1,82	10,18
N5	Kontrolle	3,6	1,59	0,36	1,11	10,89
N5	Allergen	4,2	1,61	0,42	0,95	11,05
N5	Allergen, 1. FS	3,8	1,62	0,38	1,05	10,95
N5	Allergen, 4. FS	3,9	1,61	0,39	1,03	10,97
N5	Allergen, 5. FS	3,5	1,61	0,35	1,14	10,86
N6	Kontrolle	5	1,56	0,5	0,80	11,20
N6	Allergen	5	1,56	0,5	0,80	11,20
N6	Allergen, 1. FS	4,9	1,56	0,49	0,82	11,18
N6	Allergen, 4. FS	6,1	1,54	0,61	0,66	11,34
N6	Allergen, 5. FS	4,6	1,62	0,46	0,87	11,13
N7	Kontrolle	2,3	1,58	0,23	1,74	10,26

Patient	Inkubation mit	OD-Messung:	Konzentration:	benötigte Menge [µl]:	benötigte Menge [µl]:	benötigte Menge [µl]:
		µg/ml	260/280	µg/µl	RNA	Wasser
N7	Allergen	1,7	1,61	0,17	2,35	9,65
N7	Allergen, 1. FS	1,2	1,61	0,12	3,33	8,67
N7	Allergen, 4. FS	1,7	1,56	0,17	2,35	9,65
N7	Allergen, 5. FS	1,5	1,62	0,15	2,67	9,33
N8	Kontrolle	2,8	1,56	0,28	1,43	10,57
N8	Allergen	4,1	1,54	0,41	0,98	11,02
N8	Allergen, 1. FS	5,5	1,54	0,55	0,73	11,27
N8	Allergen, 4. FS	4,6	1,54	0,46	0,87	11,13
N8	Allergen, 5. FS	4,4	1,55	0,44	0,91	11,09
N9	Kontrolle	3,8	1,57	0,38	1,05	10,95
N9	Allergen	5,2	1,58	0,52	0,77	11,23
N9	Allergen, 1. FS	2,5	1,54	0,25	1,60	10,40
N9	Allergen, 4. FS	4,3	1,55	0,43	0,93	11,07
N9	Allergen, 5. FS	4,7	1,56	0,47	0,85	11,15
N10	Kontrolle	8,7	1,48	0,87	0,46	11,54
N10	Allergen	2,6	1,49	0,26	1,54	10,46
N10	Allergen, 1. FS	4,8	1,47	0,48	0,83	11,17
N10	Allergen, 4. FS	1,6	1,5	0,16	2,50	9,50
N10	Allergen, 5. FS	4,8	1,49	0,48	0,83	11,17

### 9.7. Besitzer-Einverständniserklärung

Ich bin einverstanden, meinen Hund in die Studie zur Evaluierung der Wirkung von essentiellen Fettsäuren auf die Immunantwort bei Hunden mit atopischer Dermatitis und gesunden Hunden einzuschließen. Mit dieser Studie erhoffen wir mehr über die Funktionsmechanismen der essentiellen Fettsäuren zu erfahren.

Ich bin einverstanden, dass meinem Hund eine Blutprobe für die oben erwähnte Studie entnommen wird. Die Kosten für die Blutentnahme und der Weiterverarbeitung werden von einer klinikinternen Finanzierung übernommen.

---

Unterschrift

Datum

---

Betreuende Person

Datum

## 9.8. Besitzerfragebogen

**Welche Hautprobleme hat Ihr Hund?** \_\_\_\_\_

In welchem Alter traten diese das erste Mal auf? \_\_\_\_\_

Gab es zuvor eine Hauterkrankung?  Ja  Nein

### Varieren die Symptome?

Ist Ihnen eine saisonale Häufung der Symptome aufgefallen, verschlimmern sich die Symptome im:  Frühjahr?  Sommer?  Herbst?  Winter?

Treten Symptome das ganze Jahr auf?  Ja  Nein

Wenn ja, ist Ihnen eine Zeit aufgefallen, in welcher keine Symptome vorkamen?  Ja  Nein

Gibt es etwas, was die Symptome verstärkt? \_\_\_\_\_

Was hilft Ihrem Hund? \_\_\_\_\_

### Allgemeine Fragen:

Haben Sie andere Haustiere, wenn ja, wieviele jeweils? \_\_Katzen \_\_Hunde \_\_Vögel \_\_andere

Kennen Sie Eltern, Wurfgeschwister, etc. Ihres Hundes mit Hautproblemen?  Ja  Nein

Haben Sie oder Familienmitglieder Hautprobleme?  Ja  Nein

Wo schläft Ihr Hund? \_\_\_\_\_

Hat Ihr Hund andere Erkrankungen? \_\_\_\_\_

### Baden und Flobehandlungen:

Baden: \_\_\_\_\_ hilft \_\_\_\_\_ verschlimmert \_\_\_\_\_ keine Änderung der Symptomatik

Wie oft baden Sie Ihren Hund?  wöchentlich  monatlich  seltener

Wann haben Sie das letzte Mal einen Floh im Fell Ihres Hundes gesehen? \_\_\_\_\_ auf anderen Tieren? \_\_\_\_\_

Welches Flohmittel verwenden Sie für Ihren Hund? \_\_\_\_\_

Werden andere Haustiere gegen Flöhe behandelt? \_\_\_\_\_

### Medikamentelle Vorbehandlung:

Falls Ihr Tier vorbehandelt ist, wissen Sie welche Medikamente verwendet wurden? \_\_Ja \_\_Nein

Wenn ja, waren es:  Shampoos  Spülungen  Injektionen  Tabletten  Salben



Letzte Tablettengabe (Datum): \_\_\_\_\_ Veränderung:  keine  teilweise  gut

Letzte Injektion (Datum): \_\_\_\_\_ Veränderung:  keine  teilweise  gut

Bekommt Ihr Hund Herzwurmtabletten?  Nein  Ja:  täglich  monatlich

### **Diät:**

Was frisst Ihr Hund normalerweise: Nassfutter, Trockenfutter, Tischreste, Fleisch oder etwas anderes?

Wieviel bekommt er von jedem anteilig (%)? \_\_\_\_\_

Bekommt er andere Futtermittel? (z.B. Vitamine, Toast, Süßigkeiten) \_\_\_\_\_

Haben Sie in der Vergangenheit bereits Spezialfutter gefüttert?  Nein  Ja Welches?

\_\_\_\_\_

### **Welche Symptome hat Ihr Hund?**

Haben Sie eines der folgenden Symptome beobachtet?

- Entzündung  Juckreiz  Schuppen  Haarverlust  Geruch  Rötung
- nässende Wunden  Ohrprobleme  Augenausfluss  "Hitze"  Gewichtsverlust
- Gewichtszunahme  Erbrechen  Durchfall  Müdigkeit  Depression
- gesteigerter Appetit  gesteigerter Durst

Ist Ihnen bei Ihrem Hund aufgefallen, dass er:

- im Gesicht kratzt  an den Pfoten leckt  an den Körperseiten kratzt  auf den Rücken rollt
- sich in die Taillienregion beißt  am Bauchbereich leckt  nießt  schnaubt...andere Symptome zeigt? \_\_\_\_\_

## Lebenslauf

Name: Melanie Elisabeth Stehle

Adresse: Ritterstraße 20  
88048 Friedrichshafen am Bodensee

Telefonnummer: 07544/4684 und 0176/23497242

E-Mailadresse: [Melaniestehle@gmx.de](mailto:Melaniestehle@gmx.de)

Beruf: Tierärztin

Geburtstag: 12.10.1977 in Friedrichshafen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung: 1984 - 1988 Grundschule Fischbach  
1988 - 1994 private Realschule St. Elisabeth in Friedrichshafen  
1994 - 1997 Ernährungswissenschaftliches Droste-Hylshoff  
Gymnasium in Friedrichshafen

Berufsausbildung: 1997 - 1999 Ausbildung zur Tierarzhelferin in Gemischtpraxis  
Michael Scheirle in Friedrichshafen-Ailingen

Berufsausübung: 1999 - 2000 Anstellung als Tierarzhelferin in Gemischtpraxis  
Michael Scheirle in Friedrichshafen-Ailingen

Studium: 2000 - 2006 Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-  
Universität München , Approbation am 2.2.2006

Dissertation: März 2006 - Oktober 2007 Promotionsstudium und Mitarbeit in  
der Abteilung Dermatologie und Allergologie der LMU Mün-  
chen

Praktika:

2003

Vierwöchiges Praktikum in Gemischtpraxis Michael Scheirle in Friedrichshafen-Ailingen

Dreiwöchige Mitarbeit in einem Kastrationszentrum in Neapel/Italien mit den Schwerpunkten Kastrationen von Straßenhunden/-katzen, Einfangen von Straßentieren, Tierheimbetreuung, Sprechstundenmithilfe

2004

ab 2004 regelmäßige Mitarbeit in Kleintierpraxis Markus Ströbele in Friedrichshafen, Assistenz in Sprechstunde und bei Operationen

Januar 2004 - Mai 2005 Famulatur in der medizinischen Kleintierklinik der LMU München

Dreiwöchiges Praktikum im Schlachthof Mengen/Baden-Württemberg

Dreiwöchiges Praktikum in Lebensmittelüberwachung des Landratsamtes Bodenseekreis in Friedrichshafen

2005

Achtwöchiges Praktikum in der Vet-Suisse-Universität Zürich/Schweiz in den Bereichen Innere Medizin, Chirurgie und Gynäkologie

Achtwöchiges Praktikum in der Tierklinik Oberhaching bei München

Zweiwöchiges Praktikum in Kastrationszentrum in Neapel/Italien

2006

Seit 2006 Promotionsstudium in der Medizinischen Kleintierklinik/Dermatologie

zweiwöchige Urlaubsvertretung in Kleintier-/Pferdepraxis Markus Ströbele in Friedrichshafen

2007

vierwöchige Urlaubsvertretung in Kleintier-/Pferdepraxis Markus Ströbele in Friedrichshafen

## **Danksagung**

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Ralf Müller für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung unter seiner Betreuung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Seine zu jeder Zeit uneingeschränkte Unterstützung, Hilfsbereitschaft in allen labortechnischen Krisensituationen sowie die stetige freundliche Zusammenarbeit waren eine Bereicherung.

Herrn Professor Thomas Göbel danke ich für die sehr freundliche Zusammenarbeit und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre, die ich während dieser Zeit sehr schätzte.

Frau Professor Katrin Hartmann danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Medizinischen Kleintierklinik erstellen zu können und sie mir somit die Möglichkeit gab, mein Wissen in der Dermatologie vertiefen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Lief Nielsen von der Firma Boehringer Ingelheim, Niederlassung Dänemark für die freundliche Zusammenarbeit und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Matthias Hanczaruk, der mich in grenzenloser Geduld in die hochsensiblen Methoden im Labor einwies und mir immer freundlich und humorvoll zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Susanne Schwarz, Frau Dr. Birgit Viertböck, Frau Ramona Schmitt, Frau Bärbel Amann und Herrn Dr. Stefan Härtle für die stets freundliche Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch der mir ans Herz gewachsenen Kollegen aus der Dermatologie bedanken. Mein Dank richtet sich vor allem an Frau Dr. Nina Glos, Frau Daniela Meyer, Frau Dr. Kerstin Henneveld, Frau Dr. Kathrin Jaeger, Frau Dr. Ursula Mayer, Frau Dr. Britta Schnabl, Frau Amelie von Voigts-Rhetz und Frau Martina Ley für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Probenentnahme und für die freundliche klinische Zusammenarbeit.

Mein tiefer Dank gilt außerdem Frau Dr. Anna May, Herrn Ferdinand Schmitt, Frau Tanja Fichtner, Frau Cornelia Völzke und Frau Silke Weiss für die moralische und freundschaftliche Unterstützung in dieser Zeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Gerhard bedanken, dafür, dass er mir zu jeder Zeit unterstützend und mit viel Geduld und Verständnis zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle, ausdauernde und moralische Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung der Dissertation bedanken.