

Aus dem Institut für Tierpathologie  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Walter Hermanns)

und der Medizinischen Kleintierklinik  
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann)  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Über den Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf kutane  
Mastzellen und eosinophile Granulozyten bei Hunden mit atopischer Dermatitis**

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

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

vorgelegt von

Daniela Denk  
aus München

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Müller

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</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. Humane atopische Dermatitis.....	3
2.1.1.1. Klinik der humanen atopischen Dermatitis .....	3
2.1.1.2. Pathogenese der humane atopischen Dermatitis.....	4
2.1.1.3. Histopathologie der humanen atopischen Dermatitis .....	5
2.1.2. Canine atopische Dermatitis.....	6
2.1.2.1. Klinik der caninen atopischen Dermatitis.....	6
2.1.2.2. Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis .....	8
2.1.2.3. Mastzellen und eosinophile Granulozyten .....	11
2.1.2.3.1. Morphologie und Physiologie der Mastzelle.....	11
2.1.2.3.2. Morphologie und Physiologie des eosinophilen Granulozyten ..	14
2.1.2.4. Histopathologie der caninen atopischen Dermatitis.....	18
2.1.3. Therapie der caninen atopischen Dermatitis.....	21
2.1.3.1. Glukokortikoide.....	21
2.1.3.2. Zyklosporine.....	22
2.1.3.3. Antihistaminika .....	23
2.1.3.4. Allergenspezifische Immuntherapie.....	23
2.1.3.5. Fettsäuren .....	24
2.1.3.5.1. Nomenklatur.....	24
2.1.3.5.2. Allgemeines zur klinischen Bedeutung und Wirkung.....	25
2.1.3.5.3. Essentielle Fettsäuren und die epidermale Lipidbarriere .....	26
2.1.3.5.4. Essentielle Fettsäuren und Zellmembranen.....	27
2.1.3.5.5. Fettsäuren und das Immunsystem .....	27
2.1.3.5.6. Eicosanoide.....	29
2.1.3.5.7. Fettsäuren als Therapie .....	31
2.1.4. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	32
<b>III Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1. Einschlusskriterien für die Hunde in die Studie .....	33
3.2. Anamnestische Patientendaten.....	33

3.2.1.	Altersverteilung .....	33
3.2.2.	Geschlechtsverteilung.....	34
3.2.3.	Gruppenverteilung und Fettsäuregabe .....	34
3.3.	Studienprotokoll.....	34
3.4.	Biopsieprobenentnahme .....	35
3.5.	Fixation.....	35
3.6.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung.....	35
3.7.	Färbung der Paraffinschnitte .....	36
3.7.1.	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	36
3.7.2.	Giemsa Färbung .....	37
3.7.3.	Luna Färbung .....	37
3.8.	Immunhistochemie .....	38
3.8.1.	Allgemeines zur Methodik.....	38
3.8.2.	Durchführung .....	39
3.9.	Bestimmung der Zellzahlen.....	43
3.10.	Bestimmung des Variationskoeffizienten .....	45
3.11.	Statistische Berechnungen .....	45
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1.	Histopathologische Befunde.....	46
4.2.	Bestimmungen der Zellzahlen und der Numbers of Profiles per Area.....	53
4.3.	Auswertung des Variationskoeffizienten.....	53
4.4.	Statistische Berechnungen.....	53
4.5.	Korrelation der pathologischen und klinischen Befunde.....	55
<b>V</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
5.1.	Interpretation der Studienergebnisse .....	58
5.1.1.	Überlebensdauer von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten .....	58
5.1.2.	Einfluss des Studienzeitraumes.....	61
5.1.3.	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Zellmediatoren.....	61
5.1.4.	Möglicher Einfluss anderer Zelllinien .....	63
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>VII</b>	<b>Summary .....</b>	<b>67</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>IX</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>91</b>
9.1.	Tabellenverzeichnis.....	91

9.2.	Abbildungsverzeichnis.....	91
9.3.	Lösungen für das Färben und die Immunhistochemische Behandlung der Paraffinschnitte .....	92
9.3.1.	Phosphatpuffer .....	92
9.3.2.	Giemsa-Gebrauchslösung .....	92
9.3.3.	Essigsäure .....	92
9.3.4.	Eosin.....	93
9.3.5.	Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung.....	93
9.3.6.	Saure Ethanollösung.....	93
9.3.7.	Lithium-Karbonat-Lösung.....	94
9.3.8.	Citratpuffer .....	94
9.3.9.	TBS-Puffer .....	94
9.4.	Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medikamente.....	95
9.5.	Verbrauchsmaterialien .....	96
9.6.	Geräte in alphabetischer Reihenfolge .....	97
9.7.	Übersichten über die Zellzahlergebnisse .....	98
9.7.1.	Ergebnisse für Mastzellen.....	98
9.7.2.	Ergebnisse für eosinophile Granulozyten .....	100
9.8.	Werte für den Variationskoeffizient in %.....	102
9.9.	Übersicht über die klinischen und Pruritus Scores .....	105
9.10.	Übersicht über die statistischen Werte .....	106
9.10.1.	Berechnungen Mastzellen .....	106
9.10.2.	Berechnungen eosinophile Granulozyten .....	106
9.11.	Fragebögen .....	107
9.11.1.	Owner Consent Agreement .....	107
9.11.2.	Evaluation Form.....	108
9.11.3.	Client Questionnaire .....	109
	<b>Danksagung .....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (engl. <i>Arachidonic Acid</i> )
ALA	$\alpha$ -Linolsäure (engl. <i>Alpha-Linolenic-Acid</i> )
AD	atopische Dermatitis
ANOVA	One-way Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
ASIT	Antigenspezifische Immuntherapie
BSL	Biebrich-Scharlach-Lösung
C	Kohlenstoff
CAD	canine atopische Dermatitis
CD	engl. Cluster of <i>Differentiation</i>
CF	Chemotaxisfaktor
COX	Zyklooxygenase
CV	Variationskoeffizient (engl. <i>Coefficient of Variation</i> )
DGLA	Dihomogammalinolensäure (engl. <i>Dihomogamma-Linolenic Acid</i> )
DHA	Docosahexaensäure (engl. <i>Docosahexanoic Acid</i> )
Dr.	Doktor
ECF-A	engl. <i>Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis</i>
ECP	engl. <i>Eosinophil Cationic Protein</i>
EDN	engl. <i>Eosinophil Derived Neurotoxin</i>
EPA	Eicosapentaensäure (engl. <i>Eicosapentanoic Acid</i> )
EPO	Eosinophilen Peroxidase
FD	Formaldehyd
FS	Fettsäuren
GLA	Gamma-Linolensäure (engl. <i>Gamma Linolenic Acid</i> )
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor (engl. <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
HBSG	Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex

HETE	Hydroxyeikosatetraensäure (engl. <i>Hydroxy-eicosatetraenoic Acid</i> )
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (engl. <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i> )
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
LFA	Lymphozyten funktions-assoziiertes Molekül (engl. <i>Lymphocyte Function Associated Molecule</i> )
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KP	Kommerzielle Produkt-Gruppe (3V Caps, DVM Pharmaceuticals, Miami, Florida, USA)
LA	Linolsäure (engl. <i>Linoleic Acid</i> )
LMU	Ludwigs-Maximilians-Universität
LO	Leinölgruppe (Flaxseed oil capsules, Traco Labs, Champaign; Illinois, USA)
LOX	Lipooxygenase
LT	Leukotrien
Mac-1	Makrophagenantigen 1 (engl. <i>Macrophage Antigen-1</i> )
MBP	engl. <i>Major Basic Protein</i>
MCC	Mastzellen, die Chymase enthalten (engl. <i>Mast Cells Containing Chymase</i> )
MCT	Mastzellen, die Tryptase enthalten (engl. <i>Mast Cells Containing Tryptase</i> )
MCTC	Mastzellen, die Tryptase und Chymase enthalten (engl. <i>Mast Cells Containing Tryptase und Chymase</i> )
Mitarb.	Mitarbeiter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NA	<i>Number of Profiles per Area</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor κB

NH	Natriumhydrogen
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (engl. <i>Platelet Activating Factor</i> )
PB	Plazebogruppe (Paraffinöl, Paraffin Oil, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
PG	Prostaglandin
PGL	Prostazyklin
pH	lat. <i>Pondus Hydrogenii</i> oder <i>Potentia Hydrogenii</i>
PL	Phospholipase
PPAR	engl. <i>Peroxisome Proliferator- Activated Receptor</i>
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl. <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic Acid</i> )
SCF	Stammzellefaktor (engl. <i>Stamm Cell Factor</i> )
SD	Standardabweichung
TARC	engl. <i>Thymus Activation Regulated Chemokine (CCL 17)</i>
TGF-a	engl. <i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
TGF-b	engl. <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	T-Helfer(zelle)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (engl. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> )
VLA	Integrin alpha4beta1 (engl. <i>Very Late Antigen</i> )
WEHG	Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung

## I Einleitung

Die canine atopische Dermatitis (CAD) stellt eine in der Kleintierpraxis häufig vorkommende Erkrankung dar (Scott und Paradis, 1990; Lund et al., 1999). Sie ist definiert als eine multifaktorielle entzündliche und juckende allergische Hauterkrankung, die auf einer genetischen Prädisposition beruht. Betroffene Hunde entwickeln eine Hypersensibilität gegen bestimmte Antigene und zeigen nach Antigenkontakt charakteristische klinische Symptome, zu denen Juckreiz an prädisponierten Hautstellen verbunden mit einer Entzündung und IgE-Antikörperbildung gegen Umweltallergene gehört (Frank, 1994; Olivry et al., 2001a; Olivry et al., 2001c). Auch die humane atopische Dermatitis (AD) stellt ein besonders unter Kindern häufig auftretendes Krankheitsbild dar und ähnelt in ihrer klinischen Symptomatik und ihren immunologischen Reaktionen der caninen atopischen Dermatitis (Nuttall et al., 2002b; Leung et al., 2004; Olivry et al., 2006).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Allergen-spezifische Immuntherapie die einzige spezifische Behandlung für die atopische Dermatitis (Willemse et al., 1984; Müller et al., 2005b). Hierbei werden die Allergene mittels Intrakutantest oder allergenspezifischen IgE-Messungen im Serum identifiziert und nach Herstellung einer Hyposensibilisierungslösung subkutan injiziert (Willemse et al., 1984; Müller et al., 2005a). Diese Therapieform ist sehr zeitintensiv, da sie in der Regel über mehrere Monate hinweg durchgeführt werden muss, und führt nicht bei allen Patienten gleichermaßen zum Erfolg (Scott et al., 1993; Müller und Bettenay, 1996; Müller et al., 2000). Daher wird oft auf symptomatische Therapien zurückgegriffen, zu denen die Gabe von Glukokortikoiden (Olivry et al., 2001a; Olivry und Müller, 2003), Antihistaminika (Marsella und Olivry, 2001; Olivry und Müller, 2003), Zyklosporinen (Olivry et al., 2002; Olivry und Müller, 2003), Pentoxyfyllin und Misoprostol (Olivry et al., 2003) oder die Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren (FS) gehört (Olivry et al., 2001c; Müller et al., 2004). Da jedoch insbesondere bei der Glukokortikoidbehandlung zahlreiche Nebenwirkungen auftreten können, gewinnen nebenwirkungsärmere Therapien mit Antihistaminika oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren zunehmend an Bedeutung. Die orale Gabe von essentiellen Fettsäuren vermindert die Entzündungserscheinungen und den Atopie-assoziierten Juckreiz der Haut (Scott et al., 1992; Logas und Kunkle, 1994). In der Humanmedizin wurden essentielle Fettsäuren neben der Behandlung der atopischen Dermatitis (Biagi et al.,

1988; Fiocchi et al., 1994; Henz et al., 1999) auch bei allergischem Asthma (Stenius-Aarniala et al., 1989; Okamoto et al., 2000), Arthritiden (Calder und Zurier, 2001), Psoriasis (Mayser et al., 1998), Morbus Crohn und autoimmunbedingten Nephritiden (Belluzzi et al., 1996) eingesetzt. Zahlreiche Studien aus der Tiermedizin beschreiben die positiven Effekte einer Fettsäureverabreichung. Klinische Besserungen konnten durch die alleinige Gabe 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), durch variable Dosen an Omega-3-Fettsäuren (Logas und Kunkle, 1994) oder Omega-3-Fettsäuren enthaltende Diäten (Glos und Müller, 2007) erreicht werden. Der klinische Teil dieser Arbeit konnte im Rahmen einer doppelt verblindeten, Plazebo-kontrollierten und randomisierten Versuchsanordnung eine durch Fettsäure-Supplementierung hervorgerufene signifikante Verbesserung klinischer Symptome bei 40% der Tiere zeigen. Bei 10-20% der Hunde wurde eine vollständige klinische Remission erreicht (Müller et al., 2004).

All diese Studien evaluieren klinische Parameter, weniger ist jedoch über die zellbezogenen Mechanismen der Fettsäurewirkung in Zusammenhang mit atopischer Dermatitis bekannt. Die Stabilisierung der epidermalen Barrierefunktion und die immunmodulatorischen Eigenschaften der mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Olivry et al., 2001c).

Histopathologisch steht bei der caninen atopischen Dermatitis eine zelluläre Infiltration mit T-Lymphozyten, Mastzellen, Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, weniger eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie einer geringen Anzahl an B-Lymphozyten im Vordergrund (Olivry et al., 1997; Olivry und Hill, 2001c).

Ziel dieser Studie war es, die histopathologischen Befunde in Hautbiopsieproben atopischer Hunde vor und nach der Gabe von Omega-3 Fettsäuren zu vergleichen und die klinischen und histopathologischen Befunde zu korrelieren.

## **II Literaturübersicht**

### **2.1. Atopische Dermatitis**

#### **2.1.1. Humane atopische Dermatitis**

Die atopische Dermatitis des Menschen stellt ähnlich der caninen Atopie ein schwerwiegendes Gesundheitsproblem dar. Sie ist definiert als erblich verankerte chronische, entzündliche Erkrankung der Haut, die mit kutaner Hyperreaktivität gegen Umwelteinflüsse, die bei nichtatopischen Individuen keine pathologischen Veränderungen hervorrufen, einhergeht (Leung et al., 2003). Die Erkrankung „atopische Dermatitis“ wurde erstmals 1808 von Willan beschrieben (Illing und Groneuer, 1991), der das klinische Erscheinungsbild „prurigoartigen Zustand“ bzw. „Ekzem“ nannte. Die Diagnose „atopische Dermatitis“ basiert auf einer Reihe klinischer Befunde, die 1980 von Hanifin und Rajka zusammengestellt wurden und bis heute weltweite Verwendung finden. Dazu gehören unter anderem Juckreiz, Ekzeme an Gesicht und Extremitäten bei Kindern und Jugendlichen, flexurale Ekzeme bei Erwachsenen, und der chronische Charakter der auftretenden Dermatitis (Hanifin und Rajka, 1980). Die ersten Symptome zeigen sich bei annähernd 90% der Patienten im Kindesalter, also in einem Alter zwischen 6 Monaten und 5 Jahren (Akdis et al., 2006). Die Prävalenz der atopischen Dermatitis liegt zwischen 10-20% bei Kindern und 1-3% bei Erwachsenen und steigt besonders in Industrieländern seit Jahrzehnten kontinuierlich an (Leung et al., 2004). Einige Studien kommen zu dem Ergebnis, dass mehr als 10% der Kinder in Nordeuropa in ihrer Kindheit mindestens einmal an AD erkranken (Leung und Bieber, 2003). Eine Erklärungsmöglichkeit für das vermehrte Auftreten der AD, insbesondere in weit entwickelten Ländern mit hohen Hygienemaßstäben, ist die sog. ‚Hygiene-Hypothese‘. Sie besagt, dass ein verringerter Infektionsdruck während der Kindheit das Risiko des Auftretens allergischer Krankheiten erhöht (Yazdanbakhsh et al., 2002).

##### **2.1.1.1. Klinik der humanen atopischen Dermatitis**

Das klinische Bild der AD ist sehr vielgestaltig und wechselt typischerweise in Abhängigkeit vom Lebensalter, dem Stadium und der Dauer der Erkrankung. Besonders stark hängt die Hautsymptomatik von der Ausprägung des Juckreizes ab.

Meist beginnt die Erkrankung im Säuglingsalter mit Milchschorf am behaarten Kopf und setzt sich nach dem dritten Lebensmonat häufig in Form von nässenden, juckenden Ekzemen mit Papulovesikeln fort (Jung und Moll, 2003). In diesem Alter besteht ein erhöhtes Risiko für bakterielle Superinfektionen, insbesondere mit *Staphylococcus aureus*. Im Schulkind- und Erwachsenenalter stehen Ekzemschübe mit starkem Juckreiz, Papeln und Lichenifikation im Vordergrund. Vielfach ergeben sich Erosionen, Exkorationen und hämorrhagische Verkrustungen als Folge des Kratzens. Die oft symmetrisch auftretenden, teils konfluierenden Ekzemherde können sekundär hyperpigmentieren. Ihre Prädilektionsstellen sind die großen Gelenkbeugen, aber auch Gesicht, Hals, oberer Brustbereich, Schultergürtel und Handrücken (Wüthrich und Schudel, 1983). Weniger stark ausgeprägte Formen treten eher lokalisiert, besonders an Finger- oder Handrücken auf (Braun-Falco et al., 1997). Die AD verschwindet häufig in der Pubertät, sie kann jedoch auch persistieren oder sich sogar erst im Erwachsenenalter entwickeln. Im Falle einer Spätmanifestation zeigen sich oft Ekzeme an Nacken, Kopf und Händen.

Atopische Dermatitis tritt häufig in Kombination mit anderen atopischen Erkrankungen wie Rhinitis allergica (oder Rhinokonjunktivitis) und Asthma bronchiale auf (Abramovits, 2005). Alle drei als Atopien bezeichnete Erkrankungen werden zu den erblichen Dispositionskrankheiten gezählt (Wüthrich und Schnyder, 1991) und sind daher nicht nur klinisch und allergologisch, sondern auch genetisch eng miteinander korreliert.

Die Diagnose der AD wird hauptsächlich auf der Basis der Klinik und der Anamnese gestellt. Laborchemische und invasive Diagnostik spielen nur eine untergeordnete Rolle. Unterstützend zur klinischen Diagnostik werden die Bestimmung des IgE (Immunglobulin E) Gehaltes im Blut, unterschiedliche Allergietests und der Atopie-Patch-Test angewandt (Novak und Bieber, 2004).

#### **2.1.1.2. Pathogenese der humane atopischen Dermatitis**

Als Auslöser der atopischen Dermatitis werden verschiedene Faktoren diskutiert. Allergene spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD. Während 20-30% der Patienten keine erhöhten Serum-IgE Werte aufweisen (intrinsische Form), finden sich bei 70-80% der AD-Patienten erhöhte Serum-IgE Werte (extrinsische Form) (Leung et al., 2004). Hautläsionen können bei 40% der Kinder

mit mittlerer bis schwerer atopischer Dermatitis durch Nahrungsmittelallergene induziert werden (Sampson, 1999). Bei sensibilisierten Patienten kommt es vor, dass Juckreiz und Hautläsionen nach intranasaler oder bronchialer Inhalation von Aero-Allergenen auftreten (Tupker et al., 1996). Durch epikutane Applikation von Aero-Allergenen, wie Hausstaubmilben, Gräsern, Hautschuppen von Tieren oder Schimmelpilzen, lassen sich bei 30-50% der Patienten mit atopischer Dermatitis ekzematöse Reaktionen provozieren (Leung et al., 2003). Eine atopische Reaktion im Zusammenhang mit Hausstaubmilben konnte sowohl durch kutanen Antigenkontakt, als auch durch Einatmen von Hausstaubmilben-Allergen induziert werden (Tupker et al., 1996).

Ein weiterer Auslöser der AD sind *Staphylococcus aureus* Bakterien, die über 90% der atopischen Hautläsionen besiedeln. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass der klinische Verlauf bei Patienten, die mit Antibiotika gegen Staphylokokken und Glucokortikosteroiden behandelt werden, besser ist als bei Patienten, die nur mit Glucokortikosteroiden behandelt werden. *S. aureus* sezerniert Superantigene, die in der Lage sind, Hautläsionen auszulösen und gegen die spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Leung et al., 2003).

In der atopischen Haut liegt zudem eine verringerte Ceramid-Konzentration vor. Daraus resultiert eine chronisch trockene Haut mit einer eingeschränkten Barrierefunktion (Imokawa, 2001). Durch manuelle Manipulation (Kratzen) kann die Barrierefunktion der Haut weiter eingeschränkt werden. Darüber hinaus existieren Studien, die belegen, dass Kratzen, Schwitzen und Stress Auslösefaktoren der atopischen Dermatitis darstellen können (Ostlere et al., 1995; Leung et al., 2003).

### **2.1.1.3. Histopathologie der humanen atopischen Dermatitis**

Histologisch lassen sich keine pathognomonischen Veränderungen finden. Die Diagnose wird, wie bereits erwähnt, anhand der Makromorphologie, des klinischen Verlaufs und der atopischen Anamnese gestellt. Das histologische Bild variiert je nach Lokalisation und Stadium der Veränderung.

Makroskopisch unveränderte Haut betroffener Patienten zeigt bereits histologische Veränderungen in Form einer geringgradigen Hyperkeratose, epidermaler Hyperplasie und einer geringgradigen betont lymphozytären dermalen Infiltration (Leung, 1995). Als Charakteristikum akuter Läsionen gilt eine mehr oder weniger

ausgeprägte Spongiose der Epidermis, die sich im Extremfall bis hin zu intraepidermalen Blasenbildungen ausweiten kann und meist mit einem zellulären Ödem einhergeht. Im Bereich des dermalen superfizialen Plexus findet sich ein perivaskuläres lymphohistiozytäres Infiltrat mit Exozytose von Lymphozyten in die spongiotischen Areale. Wenige Monozyten und Makrophagen sowie eosinophile Granulozyten sind gelegentlich anzutreffen, die Zahl der Mastzellen ist hingegen nicht erhöht (Braun-Falco und Burg, 1974; Leung, 1995; Braun-Falco et al., 1997). Subakute Läsionen zeigen meist eine moderate Akanthose und parakeratotische Hyperkeratose der Epidermis mit gelegentlicher psoriasiformer Hyperplasie. Die chronische AD ist gekennzeichnet durch überwiegend orthokeratotische Hyperkeratose und eine psoriasiforme Hyperplasie der Epidermis mit Verlängerung der Reteleisten, deren Spitzen zur Konfluenz neigen. Der dermale Papillarkörper ist fibrosiert und verbreitert, wobei kleine Blutgefäße prominent erscheinen. In den Papillenspitzen kann man ein lockeres zelluläres Infiltrat, im oberen Korium eine relativ scharf begrenzte Ansammlung betont perivaskulär gelegener Zellen sehen. Der Hauptteil des Infiltrates besteht aus Lymphozyten, bei denen es sich nach den Untersuchungen von Cormane und Mitarb. überwiegend um IgE-Antikörper tragende B-Lymphozyten handelt (Cormane et al., 1973). Mastzellzahlen können bis zum dreifachen ihres Wertes in normaler Haut erhöht sein und auch ein Anstieg der Zahl der Langerhanszellen in der Epidermis und der dermalen dendritischen Zellen ist zu verzeichnen. Neutrophile Granulozyten treten nur vereinzelt auf (Weedon, 1997), die Zahl der eosinophilen Granulozyten kann erhöht sein (Leung, 2000). Die histologischen Befunde in der Haut von Säuglingen und Kindern unterscheiden sich nicht von denen Erwachsener (Prose und Sedlis, 1960).

## 2.1.2. Canine atopische Dermatitis

### 2.1.2.1. Klinik der caninen atopischen Dermatitis

Der größte Teil (ca. 70%) der an CAD erkrankten Hunde zeigt im Alter von 1-3 Jahren erste klinische Anzeichen (Nesbitt, 1978; Willemse und van den Brom, 1983; Scott et al., 1995). Eine genetisch bedingte Rasseprädisposition ist sehr wahrscheinlich vorhanden und konnte bisher bei folgende Hunderassen festgestellt werden: **Boxer** (Willemse und van den Brom, 1983; Koch und Peters, 1994; Sture et al., 1995), **Chow Chow** (Koch und Peters, 1994) und **Cocker Spaniel**

(Saridomichelakis et al., 1999; Zur et al., 2002), **Dalmatiner** (Halliwell und Schwartzman, 1971), **Deutscher Schäferhund** (Nesbitt, 1978; Willemse und van den Brom, 1983; Zur et al., 2002), **Irish Setter** (Nesbitt, 1978), **Pudel** (Nesbitt, 1978), **Labrador und Golden Retriever** (Sture et al., 1995; Zur et al., 2002), **Shar Pei** (Saridomichelakis et al., 1999) und dem **Shiba Inu** (Masuda et al., 2000), sowie bei mehreren Terrierrassen (**Fox T., West Highland White T., Scotch T.**) (Halliwell und Schwartzman, 1971; Willemse und van den Brom, 1983; Koch und Peters, 1994; Sture et al., 1995; Saridomichelakis et al., 1999; Zur et al., 2002). Allerdings variiert diese Disposition von Region zu Region (Jaeger et al., 2006) und verändert sich auch im Laufe der Zeit (Griffin und DeBoer, 2001).

Eine Geschlechtsprädisposition konnte bislang noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden (Willemse und van den Brom, 1983; Saridomichelakis et al., 1999; Masuda et al., 2000; Bensignor und Carlotti, 2002). Nach Beobachtungen von Halliwell und Schwartzman (1971), Schick und Fadock (1986) sowie Zur und Mitarb. (2002) sind vermehrt weibliche Tiere betroffen. Im Gegensatz dazu waren bei der Studie von Saridomichelakis und Mitarb. (1999) mehr männliche Tiere an CAD erkrankt.

Zur Diagnose der CAD werden in erste Linie die Anamnese und das klinische Bild genutzt. Das Hauptsymptom ist starker Juckreiz (Nesbitt, 1978; Willemse und van den Brom, 1983), der sich durch Lecken oder Beißen an den Extremitäten und Scheuern des Kopfes an Gegenständen äußert. Dazu können anfangs Hautveränderungen in Form von Erythem und Papeln kommen. Auch eine rötliche bis braune Verfärbung der Haare kann beobachtet werden. Neben Kopf und Ohren sind Pfoten, Axillar- und Inguinalgegend (Nesbitt, 1978), sowie die Extensor- und Flexorseite verschiedener Gelenke betroffen (Willemse und van den Brom, 1983). Durch Selbsttraumatisierung kommt es zum Auftreten sekundärer Veränderungen, wie Abschürfungen, Lichenifikation, Schuppenbildung, Alopezie und Hypermelanose (Halliwell und Schwartzman, 1971; Scott, 1981). Weiterhin können Komplikationen in Form von Pyodermien oder Malassezia-Dermatitiden auftreten (Griffin und DeBoer, 2001). Bei ungefähr der Hälfte der an CAD erkrankten Hunde kann eine erythematös-ceruminöse Otitis beobachtet werden (Prelaud, 2002). Bei bis zu 50% der erkrankten Hunde kann es außerdem zu einer Konjunktivitis kommen (Scott, 1981; Willemse und van den Brom, 1983).

In der Literatur sind zahlreiche Berichte zu finden, die viele Symptome der AD bei Hunden beschreiben. Einige dieser Studien bewerten diese Symptome als diagnostische Kriterien für AD (Schwartzman, 1968; Halliwell und Schwartzman, 1971; Chamberlain, 1974; Nesbitt, 1978; Scott, 1981; Willemse und van den Brom, 1983; Willemse, 1984). Dabei ist zu beachten, dass auch Hunde mit nicht-atopischen juckenden Hauterkrankungen (z.B. Futtermittelallergie, Räude) diese Kriterien erfüllen können (Griffin und DeBoer, 2001).

#### **2.1.2.2. Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis**

Ähnlich der humanen AD ist auch die CAD eine multi-faktorielle Erkrankung, bei der Allergene eine entscheidende Rolle spielen. Entsprechend der geographischen Lage, des Klimas und der Haltungsbedingungen können verschiedene Allergene von Bedeutung sein. Bei Hunden stammt das am häufigsten zur Erkrankung führende Allergen von der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides farinae*. Eine Allergie gegen *D. farinae* wurde in den USA bei 30% bis 71%, in Europa bei 18% bis 70% und in Japan bei 64% der Hunde mit CAD festgestellt (Nesbitt, 1978; Schick und Fadok, 1986; Koch und Peters, 1994; Saridomichelakis et al., 1999; Masuda et al., 2000). In den USA und Japan werden auch die Pollen von Bäumen und Gräsern sowie Schimmelpilzsporen als wichtige Allergene diskutiert. Im Gegensatz dazu sind diese Allergene in Europa weniger häufig Auslöser einer CAD, hier stellen vor allem Epithelien von Menschen und Katzen Allergieauslöser für den Hund dar (Koch und Peters, 1994; Sture et al., 1995; Saridomichelakis et al., 1999). Anhand der unterschiedlichen Allergene kann erklärt werden, dass die CAD bei 42-75% der Hunde saisonal (Halliwell und Schwartzman, 1971; Scott, 1981), aber auch nicht-saisonal auftreten kann. Ca. 80% der Hunde zeigen saisonal auftretende Symptome von Frühling bis Herbst, nur 20% der Tiere sind im Winter betroffen (Scott, 1981). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich bei vielen Tieren der Zeitraum, in dem klinische Veränderungen zu beobachten sind von Jahr zu Jahr verlängert, bis schließlich eine ganzjährige Symptomatik zu verzeichnen ist (Scott et al., 2001).

Nach Prelaud (2002) reagieren über 80% der an CAD erkrankten Hunde auf aerogene Allergene. Dabei werden zwei Theorien über den Weg der Allergenaufnahme diskutiert. Lange Zeit bestand die Annahme, dass der Respirationstrakt als Haupteintrittspforte zu sehen ist, und die Allergene von dort

über die Zirkulation zur Haut transportiert werden. Daher rührt auch der früher verwendete Begriff „Canine Allergic Inhalant Dermatitis“ (Nesbitt, 1978). In der Haut binden die Allergene nach dieser Theorie dann an IgE-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche und regen die Zellen zur Degranulierung an (Olivry und Hill, 2001a).

Die zweite Hypothese, die auf histologischen und klinischen Untersuchungen beruht, geht davon aus, dass die Entzündung der Haut durch Umweltallergene verursacht wird, die direkt durch das Stratum corneum der Haut penetrieren und Kontakt zu den antigenpräsentierenden Zellen der Epidermis aufnehmen. Eine Ursache hierfür könnte die gestörte Barrierefunktion der Haut bei Patienten mit Atopie sein (Olivry und Hill, 2001b). Außerdem manifestieren sich die Hautläsionen vorrangig an unbehaarten Mazerations- und Reibungsbereichen sowie als Zwischenzehenekzem (Prelaud, 2002). Auch histologische Befunde von veränderten Arealen stützen diese Theorie (siehe 2.1.2.4). In einer Studie untersuchten Marsella und Mitarb. den Einfluss der Route der Allergenexposition (oral, epikutan, Inhalation). Die Exposition erfolgte entweder oral (durch Fütterung der Hunde mit dem Allergen) oder aus der Umgebung (transkutan oder möglicherweise Inhalation). Bei der Exposition durch die Umgebung wurde ein Ohr bedeckt. Dieses zeigte nach der Exposition ebenfalls Veränderungen, die denen des unbedeckten Ohres gleich waren. Alle untersuchten Hunde entwickelten eine juckende Dermatitis. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl der Weg über die Schleimhäute, als auch der transkutane Weg eine Rolle spielen, wobei der letztere wichtiger ist und zu länger andauernden Symptomen führt (Marsella et al., 2006a).

Von pathophysiologischer Bedeutung sind die in den Hautläsionen von Hunden mit CAD vorkommenden stationären Zellen wie IgE-tragende Mastzellen und Langerhanszellen, die erstmals von Olivry und Mitarb. nachgewiesen wurden (Olivry et al., 1996), sowie chemotaktisch rekrutierte Zellen (eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten) (Olivry et al., 1997). In der Pathogenese der CAD spielen dabei die stationären Zelltypen eine wichtige Rolle. So sind Mastzellen für das Auftreten der allergischen Sofortreaktion vom Typ I verantwortlich, indem sie nach der Kreuzvernetzung von zwei oberflächlich gebundenen IgE-Antikörpern über ein Allergen (bridging) degranulieren und entzündungsfördernde Mediatoren freisetzen (Lloyd, 1989; Scott et al., 1995; Hill und

Martin, 1998). Außerdem sind sie an der Spätreaktion der CAD beteiligt (Nagai et al., 2000) (siehe auch 2.1.2.3.1 und 2.1.2.4.).

Langerhanszellen sind antigen-präsentierende Zellen (Mitglieder des dendritischen Zellsystems), die zur zellulären Immunität der Haut beitragen, da sie Antigene über den MHC-Komplex binden und den T-Lymphozyten präsentieren. Humane Langerhanszellen können auf ihrer Oberfläche außerdem drei verschiedene IgE-Rezeptoren (niedrig-affine CD23/Fc $\epsilon$ RII-Rezeptoren, hoch-affine Fc $\epsilon$ RI-Rezeptoren und das IgE-Bindungsprotein Galektin3/ $\epsilon$ BP) exprimieren (Wollenberg und Bieber, 2000). Die Bindung von allergen-spezifischem IgE an Langerhanszellen führt zum einen zur Aktivierung der Zellen und Abgabe von Mediatoren, die eosinophile Granulozyten und Makrophagen anlocken (Olivry et al., 1997), zum anderen werden die gebundenen Allergene in den Lymphknoten den T-Zellen präsentiert (Banfield et al., 2001; Novak und Bieber, 2004). Das führt zur Ausbildung von CD4+ und CD8+ T-Helferzellen, die wiederum B-Lymphozyten zur Bildung von allergen-spezifischem IgE anregen. Die Expression der Oberflächenantigene (CD4 oder CD8) und der T-Zell-Rezeptoren ( $\alpha\beta$ -Rezeptor oder  $\gamma\delta$ -Rezeptor) ist bei Mensch und Hund unterschiedlich. Der  $\gamma\delta$ -Rezeptor scheint bei der AD nur beim Hund vorzukommen und besitzt die Fähigkeit, den Isotyp-Wechsel von IgM zu IgE in B-Lymphozyten zu induzieren (Olivry et al., 1997).

Neben den stationären, antigenpräsentierenden Zellen sind auch chemotaktisch rekrutierte Zellen von großer Bedeutung. Anhand der produzierten Zytokine werden zwei Subtypen von T-Helferzellen unterschieden. In der initialen Phase der CAD findet man in den betroffenen Hautarealen vor allem Th2-Zellen und deren Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-16 sowie Interferon (IFN)- $\gamma$  (Nuttall et al., 2002a, b). IL-4 induziert die IgE-Synthese in B-Lymphozyten. Hayashiya und Mitarb. beschreiben eine erhöhte Expression von IL-4- und IL-5-mRNA in Monozyten von Hunden mit CAD (Hayashiya et al., 2002). In dieser Untersuchung konnte auch eine Vermehrung der eosinophilen Granulozyten im Blut bei erkrankten Tieren festgestellt werden. Diese Eosinophilie wird durch IL-5, einen wichtigen Faktor für die Differenzierung und Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten, induziert.

Aktivierte Eosinophile bewirken in der Haut über die Ausschüttung von IL-12 eine Differenzierung der T-Helferzellen zu Th1-Zellen. Diese produzieren hauptsächlich IFN- $\gamma$  und sind charakteristisch für die chronische Phase der CAD. In den

Hautläsionen erkrankter Hunde konnte entsprechend eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Genexpression festgestellt werden (Nuttall et al., 2002a).

Neben der Wirkung verschiedener Allergene können auch Defekte in der Lipidschicht der Haut eine Rolle bei der Ausbildung der CAD spielen. Wie bereits erwähnt, weisen Menschen mit AD häufig eine abnorme Trockenheit der Haut auf (siehe 2.1.1.2). Die äußerste Schicht der Epidermis besteht aus abschilfernden Keratinozyten, umgeben von interzellulären Lipiden. Diese Lipide sind für die normale Barriere- und Schutzfunktion der Haut von entscheidender Bedeutung. Fehlerhafte lipidhaltige Organellen, die Lamellarkörper, könnten zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der epidermalen Lipidbarriere führen, was einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust zur Folge hat (Fartasch und Diepgen, 1992; Fartasch, 2005).

### **2.1.2.3. Mastzellen und eosinophile Granulozyten**

#### **2.1.2.3.1. Morphologie und Physiologie der Mastzelle**

Die Vorläufer der Mastzellen stammen aus dem Knochenmark von CD34+, c-kit+ und IgE-RI- Stammzellen ab (Li und Krilis, 1999). Sie werden über das Blut in verschiedene Gewebe transportiert, in dem sie zu Mastzellen ausreifen. Zwei Mechanismen regulieren den Reifungsprozess. Im ersten Differenzierungsschritt binden die Vorläuferzellen über ihren c-kit-Tyrosinkinase-Rezeptor den Stammzellfaktor (SCF), der unter anderem die Synthese der Mastzellmediatoren Heparin, Serotonin, und der Proteasen reguliert. Anschließend erfolgt eine weitere Differenzierung durch die T-Zell-Zytokine IL-3, -4, -9 sowie -10 (Janeway und Travers, 1997; Hill und Martin, 1998).

Reife Mastzellen befinden sich im lockeren Bindegewebe entlang von Blutgefäßen und Nerven und sind vermehrt in der Schleimhaut des Magen-Darmtraktes, der Lunge und in der Haut anzutreffen. Sie sind ca. 20-30  $\mu\text{m}$  im Durchmesser groß, besitzen eine runde, ovale oder spindelförmige Gestalt und ellipsoide Zellkerne (Lieblich, 1983). Im Zytoplasma finden sich basophile, metachromatische Granula, die u.a. Heparin, Histamin, chemotaktischen Faktoren und Proteasen (Chymase und Tryptase) enthalten.

Anhand morphologischer und funktioneller Gesichtspunkte können Mastzellen in Subtypen eingeteilt werden. Beim Hund lassen sich anhand des Gehalts an

Proteasen drei Subtypen unterscheiden, nämlich Mastzellen, die nur Tryptase enthalten (MCT), solche, die Tryptase und Chymase enthalten (MCTC) und Mastzellen, die nur Chymase enthalten (MCC). In der Haut von Hunden findet man zu ca. 70% MCTC-Zellen, zu ca. 20% MCC-Zellen und nur einen geringen Anteil an MCT-Zellen (Kube et al., 1998; Welle et al., 1999).

Mastzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche dauerhaft den hoch-affinen IgE-bindenden Rezeptor FcεRI. Durch das Enzym Papain können IgE-Moleküle in drei Fragmente zerlegt werden. Man unterscheidet dadurch zwei antigenbindende Fragmente (Fab) von dem Fc-Fragment. Eine neue Konfiguration des IgE-Moleküls erfolgt, wenn es über seine Cε3-Domäne der Fc-Region an die α-Untereinheit des Rezeptors gebunden hat. Nach der Konfigurationsänderung können polyvalente Antigene an die Fab-Arme des IgE binden. Das bewirkt eine Kreuzvernetzung von zwei Rezeptoren (receptor bridging) und damit die Mastzellenaktivierung mit Ausschleusung der Granula (Sayers und Helm, 1999). Phylogenetisch spielt dieser Mechanismus eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen parasitäre Infektionen (Miller, 1996). Neben Parasiten-spezifischen IgE-Antikörpern können auch andere z.B. Allergen-spezifische IgE-Antikörper an den FcεRI-Rezeptor von Mastzellen binden. Bei Re-Exposition mit dem Allergen kommt es zur Rezeptorenvernetzung und Aktivierung der Mastzelle, was zur exozytotischen Ausschleusung vorgefertigter Mediatoren und zur Synthese und Ausschüttung von Lipidmediatoren und Zytokinen führt.

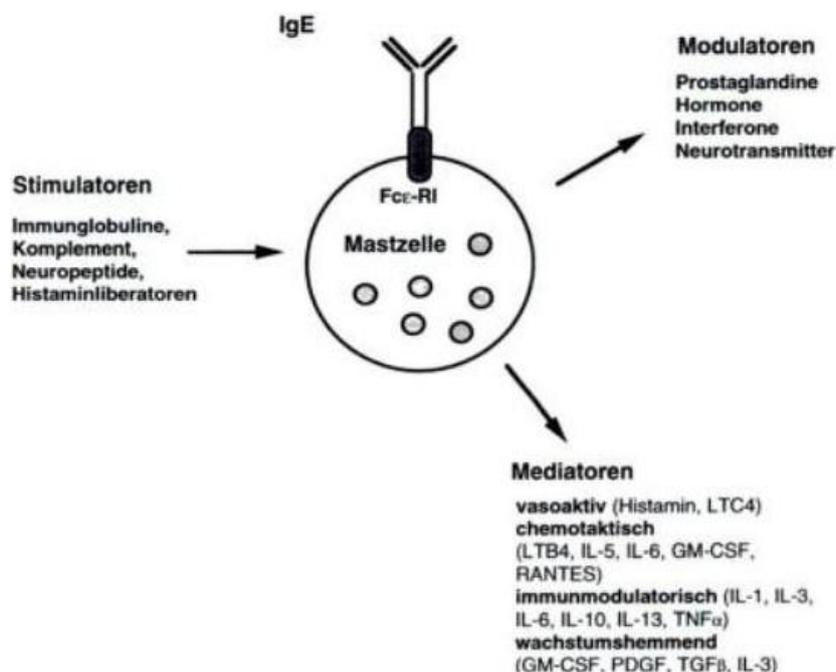
Folgenden Mediatoren können aus Mastzellen freigesetzt werden (Tabelle II-1):

Substanzklasse	Mediatoren	Wirkung
Biogene Amine	Histamin Serotonin	Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöht cAMP, Steigerung der Gefäßpermeabilität
Chemotaktische Faktoren	ECF-A NCF	Chemotaxis von Eosinophilen und Neutrophilen Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten
Zytokine	IL-4, IL-1 IL-3, IL-5 TNF-α	Stimulierung der TH <sub>2</sub> -Zellen Aktivierung von eosinophilen Granulozyten Bildung von Zytokinen, Endothelzellaktivator
Lipidmediatoren	LTB, C, D, E	Leukozytenchemotaxis, -aktivierung, -

	PGD PAF	degranulation , Erhöhung der Gefäß- permeabilität, Vasokonstriktion Vasodilatation und Ödembildung Chemotaxis von Leukozyten, Gefäßerweiterung, Aggregation von Blutplättchen
Proteoglykane	Heparin	Antikoagulans, Hemmung proteolytischer Enzyme
Proteolytische Enzyme	Tryptase, Chymase, Cathepsin G	Abbau von Peptiden (z.B.: Bradykinin), Abbau der Bindegewebsmatrix und Aktivierung des Komplementfaktors C3

**Tabelle II-1: Mastzellmediatoren und ihre Wirkmechanismen (Lloyd, 1989; Scott et al., 1995; Hill und Martin, 1998)**

(Verwendete Abkürzungen: CF = Chemotaxisfaktor, ECF-A = Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis, IL = Interleukin, LT = Leukotrien, PAF = Plättchenaktivierender Faktor, PG = Prostaglandin, TNF = Tumornekrosefaktor)



**Abbildung II-1:**  
Graphische Darstellung der  
Mastzellstimulatoren, -  
modulatoren und -mediatoren  
sowie deren Wirkspektrum  
(Ganten und Ruckpaul, 1999).

Die Freisetzung von Mediatoren kann innerhalb weniger Minuten (Sofortreaktion) oder nach 3 bis 48 Stunden (Spätphasenreaktion) erfolgen. Zudem wird eine

schlagartig erfolgende anaphylaktische Degranulation von einer kontinuierlichen („piecemeal“) Degranulation unterschieden (Moqbel und Lacy, 1999; Nagai et al., 2000). Bei der Entstehung der AD spielen sowohl die Sofortreaktion als auch die Spätphasenreaktion eine wichtige Rolle (Irani et al., 1989).

#### **2.1.2.3.2. Morphologie und Physiologie des eosinophilen Granulozyten**

Reife eosinophile Granulozyten haben einen Durchmesser von ca. 12-15  $\mu\text{m}$ , einen zweigeklappten Kern und Granula, die sich durch eine besonders hohe Affinität zu dem sauren Farbstoff Eosin auszeichnen, weswegen sich diese Zellen charakteristisch anfärben lassen (Liebich, 1983). Sie stammen, wie die anderen Granulozyten, aus dem Knochenmark und entwickelt sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie den Zytokinen IL-3, IL-5 und GM-CSF aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Weller et al., 1991; Weller, 1992). Der hieraus entstehende Myeloblast reift über den Promyelozyten und Metamyelozyten zum eosinophilen Granulozyten. IL-5 ist dabei für die spezifische Differenzierung zur reifen Zelle und die Freisetzung der reifen Zelle aus dem Knochenmark notwendig (Clutterbuck et al., 1989; Sanderson, 1992). Eosinophile Granulozyten können auch in der Milz, Leber und den Lymphknoten gebildet werden. Sie haben eine durchschnittliche Aufenthaltsdauer von 8-12 Stunden in der Zirkulation und ohne Stimulation eine Lebensdauer von 8-12 Tagen im Gewebe (Young et al., 2006). Alle Granulozyten besitzen die Fähigkeit zur Adhärenz an das vaskuläre Endothel, zur Diapedese und zur Migration in das Gewebe u.a. mittels Hyaluronidase (Weller et al., 1991). Eosinophile Granulozyten neigen zur Akkumulation im Bereich von Oberflächenepithelien, besonders in der Lamina propria des Magens und Ileums, sowie dem perivaskulären und peribronchialen Lungengewebe (Young et al., 2006). Für die Funktion wichtige Proteine werden in verschiedenen eosinophilen zytoplasmatischen Granula gespeichert. Das „Major Basic Protein“ (MBP) stellt den kristalloiden Kern der Granula dar. Das „Eosinophil Cationic Protein“ (ECP), das „Eosinophil Derived Neurotoxin“ (EDN) und die Eosinophilen Peroxidase (EPO), befinden sich zusammen mit verschiedenen Zytokinen in der Matrix der sekundären Granula (Wasmoen et al., 1988). Studien aus der Humanmedizin belegen, dass MBP ein potentes Toxin für Parasiten und Säugetierzellen darstellt (Gleich, 1994) und eine Rolle bei der Gewebsschädigung der Lunge im Zusammenhang mit dem

Krankheitsbild des Asthma bronchiale spielt. Des Weiteren wird MBP eine Rolle in der Stimulierung der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen und der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten zugesprochen (Rohrbach et al., 1990; Rankin et al., 1992).

Alle vier Proteine können histaminunabhängig zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität beitragen, wobei MBP eine weit stärkere Wirkung als ECP, EPO und EDN zugesprochen wird (Minnicozzi et al., 1994). Dieser Effekt ist möglicherweise beteiligt an der Entwicklung von Ödemen bei vielen Krankheitsbildern, die mit vermehrter Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten am Ort des Krankheitsgeschehens einhergehen.

In einer Studie (Elbon et al., 1995) wurde die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in das Lungengewebe durch Gabe von Anti-IL-5 zu verhindern versucht. Diese Studie kommt zu dem Ergebnis, dass eosinophile Granulozyten und IL-5 eine maßgebliche Rolle in der Entwicklung der Hyperreaktivität spielen.

Tabelle II-2 zeigt einen Ausschnitt verschiedener Effektormechanismen des eosinophilen Granulozyten.

<b>Mediatoren</b>	<b>Biologische Wirkung</b>
MBP	Helminthotoxisch, aktiviert Mastzellen (Histaminfreisetzung), neutralisiert Heparin, bakterizid
EDN	Neurotoxin, helminthotoxisch, stimuliert RNase Aktivität
ECP	Neurotoxin, helminthotoxisch, aktiviert Mastzellen (Histaminfreisetzung)
EPO	Zytotoxisch, aktiviert Mastzellen (Histaminfreisetzung), Leukotrienaktivierung
Kollagenase	Hydrolysiert Typ I und Typ II Kollagen
Arylsulphatase B	Hydrolysiert Sulfatverbindungen
LTC <sub>4</sub>	Vasoaktiv, Kontraktion der glatten Muskelzellen, gesteigerte Mukussektion
LTB <sub>4</sub>	Migration und Aggregation von Leukozyten, Produktion von Sauerstoffradikalen, Degranulation, Freisetzung von Arachidonsäure-Metaboliten

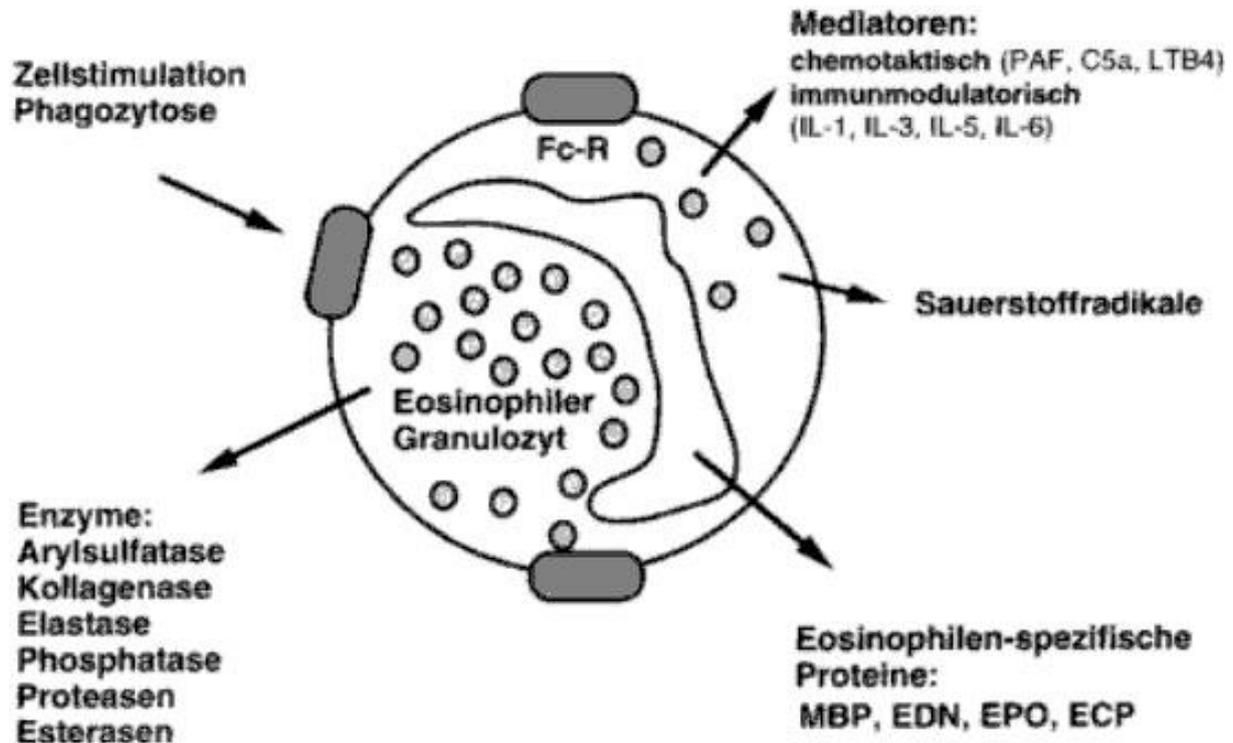
PAF	Adhärenz, Chemotaxis, Degranulation, Freisetzung von Arachidonsäure-Metaboliten, Produktion von Sauerstoffradikalen, Bronchokonstriktion, Vasodilatation
PG	Vasokonstriktion, Schleimhautödem, Hypersekretion
Thromboxan A <sub>2</sub>	Bronchokonstriktion
Sauerstoffradikale (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , OH <sup>-</sup> )	Toxisch für Mikroorganismen, Tumorzellen und andere Säugetierzellen, helminthotoxisch
Zytokine (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6)	T- und B-Zellaktivierung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, u.v.m.
Komplementfaktoren (C5a)	Mediatorsekretion, Vasokonstriktion, Chemotaxis von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen

**Tabelle II-2: Effektormechanismen des eosinophilen Granulozyten (modifiziert nach Schwenk et al., 1992; Kroegel et al., 1994; Ganten und Ruckpaul, 1999).**

(Verwendete Abkürzungen: LT = Leukotrien, ECP = Eosinophil Cationic Protein, EDN = Eosinophil Derived Neurotoxin, EPO = Eosinophilen Peroxidase, MBP = Major Basic Protein, PAF = Plättchenaktivierender Faktor, PG = Prostaglandine)

Der eosinophile Granulozyt besitzt eine Vielzahl von Rezeptoren, die in der Regel Chemotaxis, Aktivierung, Degranulation oder eine Unterstützung bei der Migration ins Gewebe vermitteln. Dazu gehören Rezeptoren für IgG, IgE, IgA, verschiedene Komplementrezeptoren, Rezeptoren für Lipidmediatoren, Leukotriene, den PAF,  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine und Rezeptoren für Glukokortikoide (Janeway und Travers, 1997).

Die Komplementproteine C3a und C5a gehören zu den chemotaktisch wirksamen Aktivatoren, die den Eosinophilen zur Degranulation anregen können. Auch IgE kann über die Bindung an niedrig-affine Rezeptoren die Sekretion basischer Proteine vermitteln (Meurer et al., 1993). Eine weitere wichtige Aktivatorzellen für die eosinophilen Granulozyten sind die Mastzellen, die unter anderem TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-5 und ECF-A sezernieren (siehe Tabelle II-1 und Abbildung II-2).



**Abbildung II-2: Rolle des eosinophilen Granulozyten bei der allergischen Entzündung (Ganten und Ruckpaul, 1999).**

Die Abwehr von parasitären Infektionen und die damit verbundene Induktion einer entzündlichen Reaktion werden bisher als die hauptsächliche Funktion der eosinophilen Granulozyten betrachtet. Die Freisetzung von basischen Proteinen und Sauerstoffradikalen wirkt allerdings auch schädigend auf körpereigenes Gewebe. Durch Freisetzung zahlreicher anderer Stoffe wie Kollagenasen, Enzymen, verschiedenen Zytokinen (IL-2,4,5,10,13, IFN- $\gamma$ ), Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, HETE, PAF, Thromboxan B<sub>2</sub>), Wachstumsfaktoren und Neurotrophinen tragen aktivierte eosinophile Granulozyten dazu bei, eine Entzündungsreaktion zu unterhalten, indem sie z.B. durch Mediatorausschüttung andere Zellen des Immunsystems aktivieren (Janeway und Travers, 1997; Woerly et al., 1999; Noga et al., 2003; Young et al., 2006). Neuere Studien, insbesondere aus der Humanmedizin, zeigen aber auch, dass eosinophile Granulozyten an entzündlichen Reaktionen ohne Parasitenbeteiligung involviert sein können. Besonders Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (atopische Dermatitis, allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis) gehen häufig mit erhöhten Zahlen von zirkulierenden und gewebsständigen Eosinophilen einher (Terada et al., 1994; Foreman et al., 1999).

#### 2.1.2.4. Histopathologie der caninen atopischen Dermatitis

Histologisch zeigt die Haut caniner atopischer Patienten, ähnlich der von humanen Atopikern wenig kennzeichnende Befunde. Olivry und Hill charakterisierten die histologischen Veränderungen als eine chronische, hyperplastische und spongiöse, gemischtzellige, betont perivaskuläre Dermatitis (Olivry und Hill, 2001c). Das entzündliche Infiltrat ist vergleichbar mit der beim Menschen auftretenden Krankheit und ebenso abhängig vom zeitlichen Verlauf und der Schwere der Erkrankung. Es besteht überwiegend aus dendritischen Zellen, T-Helferzellen, Mastzellen und wenigen intakten und degranulierten eosinophilen Granulozyten (Olivry et al., 1997). Olivry und Mitarbeiter charakterisierten 1997 das entzündliche Infiltrat der läsionalen und nicht-läsionalen Haut atopischer Hunde und verglichen es mit den Befunden nicht-atopischer Hunde. Dabei zeigte die Epidermis nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde eine geringgradige diffuse epidermale Hyperplasie und wenig entzündliches Infiltrat, das überwiegend aus epitheliotropen T-Lymphozyten bestand. Auch die Anzahl epidermaler Langerhanszellen war im Vergleich zur Haut gesunder Hunde erhöht.

In Schnitten läsionaler Haut zeigte sich eine mittelgradige bis hochgradige diffuse und ungleichmäßige epidermale Hyperplasie. In sechs von 14 Biopsieproben konnten wenige intraepidermale neutrophile Granulozyten gefunden werden. Es wurden wenige intakte eosinophile Granulozyten, die gelegentlich von freien eosinophilen Granula umgeben waren, gefunden. Exozytose und subkorneale Mikroabszesse wurden selten beobachtet. Epidermale T-Lymphozyten konnten in allen Schnitten läsionaler Haut gefunden werden. Epidermale Mastzellen wurden nicht nachgewiesen. Verglichen mit Haut gesunder Hunde und nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde fand sich in der Epidermis eine erhöhte Anzahl von Langerhanszellen.

Morphometrische Messungen ergaben eine signifikante Erhöhung dermaler Zellzahlen in der läsionalen Haut atopischer Tiere gegenüber nicht-läsionaler Haut atopischer und der Haut gesunder Hunde.

Klinisch unauffällig erscheinende Haut zeigte betont dermal gelegene perivaskuläre Infiltrate. Das mononukleäre Zellinfiltrat setzte sich aus dendritischen Zellen und T-Helferzellen zusammen.

In Biopsien läsionaler Haut konnte ein betont subepidermales perivaskuläres bis diffuses Verteilungsmuster der Infiltrate gefunden werden. Neutrophile Granulozyten

wurden in geringer Prozentzahl in allen Biopaten nachgewiesen. Signifikant erhöhte Zellzahlen eosinophile Granulozyten fanden sich in fast allen Schnitten. Der prozentuale Anteil von Mastzellen in der Dermis unterschied sich jedoch in den Schnitten unterschiedlicher Hautläsionen nicht.

In der Literatur gibt es zum **Vorkommen von Mastzellen** in der Haut von Hunden mit CAD sehr unterschiedliche Angaben. Wilkie und Mitarb. fanden im Bereich des Rückens, des Halses und des cranio-lateralen Abdomens eine deutliche Erhöhung der Mastzellzahl im Vergleich zu gesunden Tieren (Wilkie et al., 1990). Auch bei gesunden Hunden konnte jedoch eine Erhöhung der Mastzellzahlen an bestimmten Prädilektionsstellen der CAD wie Ohrmuschel und Zwischenzehenhaut nachgewiesen werden (Auxilia und Hill, 2000). Olivry und Mitarb. bemerkten eine Schwächung der Farbintensität von Mastzellgranula bei mit Anti-IgE behandelten kranken Hunden (Olivry et al., 2001b). Dies wurde auf die Degranulation der Mastzellen zurückgeführt. Eine weitere Studie untersuchte die Anzahl der Bindegewebsmastzellen und der sog. atypischen oder Schleimhautmastzellen (definiert als Mastzellen, die in formalinfixiertem Material keine Metachromasie zeigen (Befus et al., 1982) nach intradermaler Allergeninjektion bei Hunden mit CAD (Becker et al., 1986). Dabei nahm ab der 3. bis zur 24. Stunde nach der Allergeninjektion die Zahl der Bindegewebsmastzellen ab. Atypische Mastzellen waren erst nach 6 Stunden auffindbar, danach stieg ihre Zahl an. Eine mögliche Erklärung der Autoren ist, dass die atypischen Mastzellen sofort degranulierten und so nicht detektierbar sind, während die Bindegewebsmastzellen erst später degranulieren und somit für die Spätphasenreaktion verantwortlich sind. Welle und Mitarb. untersuchten die Mastzellsubtypen in gesunder und läsionaler Haut erkrankter und gesunder Tiere (Welle et al., 1999). Sie fanden dabei keine Unterschiede in der Gesamtzellzahl der mit Toluidinblau gefärbten Mastzellen. Eine zweite Färbemethode, die speziell Chymase und Tryptase färbt, zeigte ein deutlich geringeres Vorkommen der MCTC-Zellen in der Haut atopischer Hunde. Die Autoren führten das ebenfalls auf den Verlust von Mediatoren durch die Degranulation der Mastzellen bei der CAD zurück.

Weiterhin wird ein unterschiedlicher Gehalt oder eine unterschiedliche Freisetzbarkeit der Mastzellmediatoren bei der CAD diskutiert. So konnte in den Mastzellen von atopischen Hunden ein erhöhter Gehalt und eine erhöhte Freisetzung von Histamin beobachtet werden (DeMora et al., 1996). Brazis und Mitarb. dagegen konnten

keinen Unterschiede in der Histaminfreisetzung aus Mastzellen erkrankter und gesunder Hunde nachweisen (Brazis et al., 1998).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass erhöhte Mastzellzahlen in der Haut als Hinweis für das Vorliegen einer CAD gesehen werden. Dies entspricht Ergebnissen aus der Humanmedizin, die zeigen, dass bei Menschen mit allergischen Erkrankungen ein deutlicher Anstieg der Anzahl an kutanen Mastzellen zu beobachten ist (Taylor und Metcalfe, 2001). Die Zunahme der Mastzellzahlen bei entzündlichen Prozessen könnten durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden: 1.) verstärkte Einwanderung von unreifen Vorläuferzellen, 2.) Proliferation reifer Mastzellen, 3.) Einwanderung reifer Gewebszellen zum Entzündungsort, 4.) verminderte Apoptose.

Das **Vorkommen eosinophiler Granulozyten** im Zuge der CAD wurde lange kontrovers diskutiert. Noch vor einigen Jahrzehnten wurde den eosinophilen Granulozyten eine ausschließlich gewebsschützende Funktion im Zusammenhang mit parasitären und allergischen Erkrankungen zugesprochen und auch heute ist die protektive Wirkung eosinophiler Granulozyten als zytotoxische Effektorzellen bei der Abwehr von Parasiten unumstritten (Gleich, 1994). Die Aktivierung eosinophiler Granulozyten führt neben der Freisetzung von ECP, MBP, EPO und EDN zu einem vermehrten Sauerstoffmetabolismus (Respiratory Burst) der Zellen, in dessen Folge es zur Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , OH) kommt (Elsner und Kapp, 1999). Diese sind aufgrund ihrer oxidativen Wirkung in der Lage, sowohl Mikroorganismen als auch körpereigene organische Moleküle und Gewebsstrukturen zu zerstören (siehe 2.1.2.3.2). Die darüber hinaus sezernierten proinflammatorischen Zytokine wie IL-1a, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-16, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF und TNF- $\alpha$  führen ihrerseits zu einer autokrinen und parakrinen Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler und neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten und erhalten so die Entzündungsantwort aufrecht. Unter bestimmten Voraussetzungen sind eosinophile Granulozyten zudem selbst in der Lage, Chemokine wie Eotaxin, RANTES und IL-8 zu produzieren und freizusetzen und damit regulierend auf ihre eigene Chemoattraktion und Aktivierung einzuwirken (Meurer et al., 1993; Yousefi et al., 1995; Nakajima et al., 1998). Die Freisetzung von Mediatoren erfolgt erst nach vorangegangener Aktivierung des eosinophilen Granulozyten über seine membranständigen Rezeptoren. Somit besitzen eosinophile Granulozyten eine Vielzahl von Möglichkeiten der Interaktion

und spielen im Sinne einer proinflammatorischen und immunregulatorischen Effektorzelle eine bedeutende Rolle bei allergischen Reaktionen und chronisch entzündlichen Erkrankungen.

Dies konnte auch histologisch bestätigt werden, da entgegen älteren Studien, die nur ein sehr spärliches Auftreten dermalen eosinophiler Granulozyten in der Haut atopischer Patienten beschreiben, in aktuelleren Arbeiten ein vermehrtes Vorkommen intakter und degranulierter dermalen eosinophiler Granulozyten in der Haut der meisten erkrankten Tiere nachgewiesen werden konnte (Nimmo Wilkie et al., 1990; Olivry et al., 1997). In diesem Zusammenhang haben neu etablierte Färbetechniken wie z.B. die Luna Färbung (Luna, 1968) einen wichtigen Beitrag zur Detektierung degranulierter eosinophiler Granulozyten geleistet (Olivry et al., 1997).

### **2.1.3. Therapie der caninen atopischen Dermatitis**

Oft wird zur Behandlung der CAD eine Kombinationstherapie angewandt. Hierbei spielen Allergenvermeidung, anti-inflammatorische Medikation, allergen-spezifische Immuntherapie, Behandlungen zur Unterstützung der natürlichen Barrierefunktion der Haut und die Therapie von Sekundärinfektionen eine wichtige Rolle. Dabei stellt die allergen-spezifische Immuntherapie derzeit die einzige spezifische Therapieform dar.

#### **2.1.3.1. Glukokortikoide**

Glukokortikoide gehören zu den am häufigsten verwendeten entzündungshemmenden Medikamenten. Mehrere Studien bestätigen eine Wirksamkeit oral verabreichter, niedrig-dosierter Glukokortikoide bei atopischen Hunden mit Hautläsionen und/oder Juckreiz zwischen 57 und 100% (Olivry und Sousa, 2001). Die wichtigsten entzündungshemmenden Effekte beruhen zum einen auf der Hemmung der Genexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren. So wird beispielsweise in T-Lymphozyten die Synthese von Zytokinen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ ) verringert. Andererseits können Glukokortikoide auch Gene zur Translation bestimmter Proteine (z.B. Lipocortin-1) aktivieren. Lipocortin-1 hemmt die Phospholipase (PL) A<sub>2</sub>, die Fettsäuren (vorwiegend Arachidonsäure) aus den Phospholipiden der Zellmembran freisetzt. Arachidonsäure ist die Vorstufe stark entzündungsfördernder Lipidmediatoren (Olivry und Sousa, 2001). Die Hemmung der

PLA2 führt außerdem zu einer geringeren Freisetzung präformierter Entzündungsmediatoren aus Mastzellen (Willemse, 1990). Weiterhin wird eine Synthese von Ribonukleasen beschrieben, die dazu führt, dass die mRNA der induzierten Zyklooxygenase (COX-2), welche die Bildung der entzündungsfördernden Lipidmediatoren verursacht, inaktiviert wird (Olivry und Sousa, 2001). Auch Veränderungen der Oberflächenstrukturen von Zellen im Bereich von Rezeptoren (FcεRI) durch Glukokortikoide werden diskutiert (Willemse, 1990). Allerdings weisen Glukokortikoide, unter anderem aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften, auch häufig Nebenwirkungen auf, wozu Polyurie, Polydipsie, Alopezie, Polyphagie und Gewichtszunahme (10-25% der Hunde), gastrointestinale Symptome (7-25%) und Sekundärinfektionen (34%) gehören können (Olivry und Müller, 2003). Zu beachten ist außerdem, dass es bei einer Langzeittherapie zu bakteriellen Harnwegsinfektionen kommen kann (Ihrke et al., 1985).

#### **2.1.3.2. Zyklosporine**

Auch Zyklosporine weisen eine antiallergische Wirkung auf. Diese beruht vor allem auf der Unterdrückung der Aktivierung verschiedener Zellarten, die am kutanen allergischen Entzündungsgeschehen beteiligt sind (Marsella und Olivry, 2001). Alle therapeutischen, aber auch toxischen Effekte, beruhen auf der Hemmung von Calcineurin (Belluzzi et al., 1996). Zyklosporin beeinflusst sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort. Es hemmt zum einen Zellen, die immunologische Vorgänge auslösen (z.B. Langerhanszellen, Lymphozyten und Keratinozyten), zum anderen die Tätigkeit/Funktion der Zielzellen der allergischen Reaktion (z.B. Mastzellen, eosinophile Granulozyten). Dabei gleicht die Wirksamkeit von Zyklosporin A der von Glukokortikoiden, so dass es eine wertvolle Alternative darstellt (Marsella und Olivry, 2001). Die Erfolge der Reduktion von Läsionen liegen zwischen 52-67%. Die Erfolgsrate bezüglich des Juckreizes beträgt 36-100% (Olivry und Müller, 2003). Mögliche Nebenwirkungen des Zyklosporins können Erbrechen, Durchfall, Anorexie, Gewichtsverlust, kutane Papillomatose, chronische hyperplastische Gingivitis und Periodontitis sein (Marsella und Olivry, 2001).

### **2.1.3.3. Antihistaminika**

Antihistaminika werden häufig als symptomatische Therapie gegen Juckreiz bei AD eingesetzt. Sie entfalten ihre Wirkung in verschiedenen Geweben durch Antagonismus an spezifischen Histaminrezeptoren, vor allem den H1- und H2-Rezeptoren. Dadurch werden Histamin-induzierte Effekte wie Juckreiz, Schmerz und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität herabgesetzt (DeBoer und Griffin, 2001). Studien belegten eine Reduktion des Juckreizes durch Antihistaminika der ersten Generation, wie Chlorpheniramin, Diphenhydramin, Hydroxyzin oder Clemastin (Scott und Buerger, 1988; Paradis et al., 1991). Bezüglich des Juckreizes zeigten Loratadin und Terfenadin keine Wirkungen (Scott et al., 1994; Paradis, 1996). Eine Linderung der Symptomatik tritt gewöhnlich innerhalb der ersten 7-14 Tage der Behandlung auf und variiert von Patient zu Patient. Daher sollte versuchsweise auf einen anderen Wirkstoff umgestiegen werden, sollte das genutzte Antihistaminikum nicht innerhalb von zwei Wochen zum gewünschten Erfolg führen. Die klinische Wirksamkeit von Antihistaminika kann durch Kombination mit essentiellen Fettsäuren verbessert werden. Synergistische Effekte können auch in der Kombination mit Glukokortikoiden auftreten. Mögliche Nebenwirkungen beim Hund sind in der Regel mild und treten selten auf. Sie äußern sich in Sedation, anticholinergen Effekten, Zittern, Ataxie, Hyperästhesie, vermehrtem Speicheln, vermehrtem Juckreiz, Keuchen und Exzitationen (Olivry und Müller, 2003).

### **2.1.3.4. Allergenspezifische Immuntherapie**

Die spezifische Immuntherapie (ASIT) (auch Hypo- oder Desensibilisierung) stellt eine praxisrelevante Behandlungsmethode dar und wird seit Jahren in der Behandlung der atopischen Dermatitis bei Mensch und Hund eingesetzt (Nesbitt, 1978; Willemse et al., 1984; Münster und Mitsch, 1996). Dabei werden die verantwortlichen Allergene regelmäßig, in aufsteigender Konzentration und über einen längeren Zeitraum hinweg subkutan injiziert, was zu einer Modulation der Immunantwort und damit zur Verminderung der klinischen Symptomatik führt (Münster und Mitsch, 1996). Die Dosiserhöhung erfolgt bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis (Griffin und Hillier, 2001). Der Wirkungsmechanismus der spezifischen Immuntherapie beim Hund ist noch nicht genau geklärt, es gibt aber verschiedene Hypothesen (Scott et al., 1995):

1. Senkung des IgE-Spiegels (bisher nur beim Mensch beschrieben) (Münster und Mitsch, 1996)
2. Verminderte Reaktivität der Mastzellen und basophilen Granulozyten (Durham et al., 1999)
3. Induktion blockierender Antikörper (Nachweis der Zunahme von allergenspezifischem IgG beim Hund) (Hites et al., 1989)
4. Toleranzentwicklung durch Erzeugung allergenspezifischer Suppressorzellen (Willemse et al., 1984).

Es existieren verschiedene Behandlungsprotokolle für die Durchführung der ASIT. Die Unterschiede bestehen zum einen in den Applikationsintervallen und zum anderen in der Form der Allergenextrakte. Über den Erfolg der ASIT sind in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden. Zwischen 50-100% der Hunde, die einer ASIT unterzogen werden, zeigen nach mehr als 4 Monaten eine Verbesserung der Symptome um bis zu 50% (Griffin und Hillier, 2001). Schlechte Therapieerfolge wurden vor allem bei älteren Hunden beschrieben (Nesbitt 1978: 13% Erfolg bei 8-11-jährigen, DeBoer und Griffin, 2001 Alter > 5 Jahre schlechter Erfolg).

Nebenwirkungen der Immuntherapie können sowohl lokal, als auch generalisiert auftreten. Lokale Nebenwirkungen, wie Schwellung und Rötung der Injektionsstelle, sind häufig zu beobachten. Seltener kommt es zu Ödemen, Schmerzen oder Juckreiz. Generalisierte Nebenwirkungen können sich in Schwäche, Depression, Angstzuständen oder Schlaflosigkeit, Hyperaktivität, Erbrechen, Durchfall durch gesteigerte Darmmotilität und vermehrtem Schlucken, Urtikaria/Angioödem, Anaphylaxie und Juckreiz äußern (Reedy et al., 1997; Rosser, 1998; Griffin und Hillier, 2001; Scott et al., 2001). Die meisten Reaktionen treten innerhalb von 1-2 Tagen auf und verschwinden nach Stunden oder Tagen wieder (Griffin und Hillier, 2001).

### **2.1.3.5. Fettsäuren**

#### **2.1.3.5.1. Nomenklatur**

Fettsäuren bestehen grundsätzlich aus einer vorrangig unverzweigten und wegen der Synthese aus C2-Körpern (C=Kohlenstoff) meist geradzahligen Kohlenwasserstoffkette mit einer endständigen Carboxylgruppe. Je nach Grad ihrer

Wasserstoffsättigung und dem Vorliegen von Doppelbindungen spricht man von gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA). Die physiologisch vorkommenden ungesättigten Fettsäuren enthalten eine oder mehrere isolierte cis-Doppelbindungen. Sie kommen im Organismus zum geringen Teil frei vor, hauptsächlich sind sie jedoch Bausteine von Phosphoglyzeriden, Glykolipiden, Sphingolipiden oder Cholesterinestern.

Die Einteilung der ungesättigten Fettsäuren erfolgt anhand der Stellung der Doppelbindung. Die Deltanomenklatur gibt die Stellung der ersten Doppelbindung zum Carboxylende an und die Omeganomenklatur (n-Nomenklatur) beschreibt die erste Doppelbindung vom Methylende aus gezählt (z.B. Omega-3 und Omega-6-Fettsäuren). Die Umwandlung einer Fettsäure einer Familie in eine andere Fettsäurefamilie ist nicht möglich. Es werden kurzkettige FS (1 - 7 C-Atome), mittelkettige FS (8 - 12 C-Atome) und langkettige FS (> 12 C-Atome) unterschieden. Die meisten der etwa 50 natürlichen Fettsäuren haben eine Kettenlänge von acht bis 22 Kohlenstoffatomen.

#### **2.1.3.5.2. Allgemeines zur klinischen Bedeutung und Wirkung**

Eine Substanz, die vom Organismus nicht oder nicht ausreichend selbst synthetisiert werden kann und deren Fehlen zu Mangelercheinungen führt, die durch die Zufuhr dieser Substanz wieder verschwinden, wird als essentiell bezeichnet. Da Wirbeltieren die enzymatische Ausstattung fehlt, Doppelbindungen nach dem 9. C-Atom (delta 9) in Fettsäuren einzufügen, sind diese essentiell und müssen über die Nahrung aufgenommen werden (Ziboh und Chapkin, 1988). Somit stellen Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure essentielle Fettsäuren dar. Tiere und Menschen können im endoplasmatischen Retikulum und in den Peroxisomen aus diesen die entsprechenden Derivate der Omega-3- bzw. Omega-6-Familie bilden (Mimouni et al., 1991). Je nach Stoffwechsellage dienen die über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren dem Organismus zum Aufbau körpereigener Lipide oder zum Energiegewinn über die beta-Oxidation. Dabei gehen die Fettsäuren in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge und der Anzahl ihrer Doppelbindungen unterschiedlich stark in diesen Stoffwechselweg ein. Fettsäuren mit höherer Anzahl an C-Atomen werden schlechter und Fettsäuren mit höherer Anzahl an Doppelbindungen besser durch die beta-Oxidation umgesetzt (Hiltunen et al., 1986; Reubsaet et al., 1989). Ein Mangel

an essentiellen Fettsäuren äußert sich in einer schuppigen Dermatitis, einem verminderten Wachstum, einer erhöhten Wasseraufnahme bei gleichbleibender Harnabgabe und Fruchtbarkeitsstörungen (Ziboh und Chapkin, 1987). Ein Defizit an n3-Fettsäuren betrifft vor allem das Nervensystem und bedingt Polyneuropathien, reduzierte Lernfähigkeit und Störungen der Sehfähigkeit. Beim Hund kann sich ein n3-Fettsäuremangel in Blindheit manifestieren, die nur bei jüngeren Tieren reversibel ist (Waldron et al., 1998). Eine Studie konnte zeigen, dass nach 2- bis 3-monatiger Verabreichung einer Fettsäuremangeldiät Hautveränderungen in Form von stumpfem, trockenem Fell und Schuppen auftraten. Bestand der Mangel länger, traten außerdem Haarausfall und fettige Haut, besonders an den Ohren und zwischen den Zehen, auf. Diese Symptome waren durch eine 3- bis 8-wöchige Gabe einer fettsäurereichen Diät revidierbar (Watson, 1998).

#### **2.1.3.5.3. Essentielle Fettsäuren und die epidermale Lipidbarriere**

Die 1930 von Burr und Burr durchgeführten Untersuchungen über die Auswirkungen einer fettfreien Diät bei Ratten wiesen bereits auf einen Zusammenhang zwischen essentiellen Fettsäuren und der epidermalen Wasserbarriere hin. Die untersuchten Tiere zeigten nach einer Eliminationsdiät einen starken Anstieg der Wasseraufnahme, ohne dass vermehrt Wasser über den Harn ausgeschieden wurde (Burr und Burr, 1930). Das führte zu der Annahme, dass mehr Wasser über die Haut verloren ging (Ziboh und Miller, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass dieser transepidermale Flüssigkeitsverlust durch eine lokale Linolsäureapplikation ausgeglichen werden kann (Prottey, 1977). Die physikalische Struktur der epidermalen Wasserbarriere besteht aus Platten gestapelter Lipiddoppelschichten, welche die interzellulären Zwischenräume des Stratum corneum der Epidermis ausfüllen und Linolsäure (LA) enthalten (Ziboh und Miller, 1990). Fehlt diese in der Nahrung so wird sie in der Haut durch Öl- oder Meadsäure ersetzt, die jedoch nicht die gleiche Funktion übernehmen können. Eine Störung der epidermalen Wasserbarriere führt durch die erhöhte Abgabe von Wasser zu trockener und schuppiger Haut und fördert das Eindringen von Substanzen, z.B. Allergenen. Auch die Zell-Zell-Adhäsion ist ein wichtiger Teil der Lipidbarrierefunktion und essentielle Fettsäuren zeigen eine positive Wirkung auf die Ausbildung von „tight junctions“, Desmosomen und die Matrixadhäsion von Epithelzellen (Jiang et al., 2000).

#### **2.1.3.5.4. Essentielle Fettsäuren und Zellmembranen**

Die langkettigen Fettsäuren Dihomogammalinolensäure (DGLA), Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden vor allem in die zellulären Membranen eingebaut und weniger zum Energiegewinn genutzt (Sardesai, 1992b). Als Bestandteile der äußeren Zellmembran und der Membranen von Zellkernen und Mitochondrien haben diese Fettsäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Membranfluidität. Roth und Kirchgessner konnten eine Verbesserung der Hämolyseresistenz von Erythrozytenmembranen nach der Gabe von LA oder EPA bei Ratten zeigen (Roth und Kirchgessner, 1992). Calder und Mitarb. konnten nach der Verabreichung mehrfach ungesättigter Fettsäuren eine erhöhte Membranfluidität kultivierter Lymphozyten beobachten (Calder et al., 1994). Membranfettsäuren zeigen außerdem eine Wirkung auf die Aktivität von membrangebundenen Enzymen, wie der Adenylatzyklase, der 5'-Nukleotidase und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sowie auf die Rezeptoraffinität und -aktivität, die Signalübertragung und auch auf die Membranpermeabilität und Transportvorgänge innerhalb der Membranen (Sardesai, 1992c).

#### **2.1.3.5.5. Fettsäuren und das Immunsystem**

Essentielle Fettsäuren besitzen durch ihre Wirkung auf Zytokine immunmodulatorische Eigenschaften (Olivry et al., 2001b). Es konnte gezeigt werden, dass es nach der Verabreichung einer n3-fettsäurehaltigen Diät zu einer verringerten Bildung von IL-1 in den Monozyten klinisch gesunder Menschen kam (Mantzioris et al., 2000). Des Weiteren konnte nach der Verabreichung von n3-Fettsäuren eine Senkung der Synthese von IL-1 und des TNF- $\alpha$  in den Makrophagen von Mäusen beobachtet werden (Wallace et al., 2000). Bei gesunden Frauen konnte nach n-3 Fettsäuresubstitution eine Senkung der IL-2-Produktion und eine Hemmung der T-Zell-Bildung gefunden werden (Meydani et al., 1991). IL-2 ist ein starker Aktivator der T-Zell-Proliferation (Lloyd, 1989). Auch Chapkin und Mitarb. bestätigten in einem Zellkulturmodell eine hemmende Wirkung von n3-Fettsäuren auf die Lymphozytenproliferation (Chapkin et al., 2002). Eine proliferationshemmende Wirkung der Fettsäuren auf periphere Blutmonozyten wurde auch bei Hunden beobachtet (Stehle et al., 2007). EPA soll zudem einer Verminderung der Th1-

Antwort führen, die bei chronischen Entzündungen verstärkt ist (Gil, 2002). Somit besitzen n3-Fettsäuren einen immunsuppressiven Effekt.

Im Gegensatz zu den n3-Fettsäuren führte die Verabreichung einer linolsäurehaltigen Diät bei Mäusen zu einer Erhöhung von IL-6 im Plasma der Tiere (Chavali und Forse, 1999). Durch die Gabe eines  $\Delta 5$ -Desaturasehemmers konnte dies rückgängig gemacht werden, was zu einer Anreicherung von DGLA führte. Yoon und Mitarb. zeigten, dass sich durch eine DGLA-reiche Nahrung bei Menschen mit atopischer Dermatitis der IFN- $\gamma$ -Gehalt im Blutplasma erhöht (Yoon et al., 2002). Da IFN- $\gamma$  die von IL-4 ausgelöste IgE-Synthese hemmt, wäre eine Nutzung in der Therapie der atopischen Dermatitis möglich (Lloyd, 1989).

Die „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs)  $\alpha$  und  $\gamma$  stellen wichtige Transkriptionsfaktoren dar, die u.a. die Genexpression von Enzymen des Glukose- und Fettstoffwechsels beeinflussen. PPAR $\alpha$  bindet EPA und Ölsäure und seine Wirkung beruht auf der Bildung von Fettsäuretransportern und -bindungsproteinen sowie Enzymen des Fettstoffwechsels. Auch PPAR $\gamma$  bindet EPA und führt so zu einer Hemmung der Bildung von Zytokinen, der Funktion des Nuklearfaktors  $\kappa B$  und der COX-2 Expression. Auch führt diese Bindung zu einer erhöhten Expression der Lipoproteinlipase und von Fettsäuretransportern (Jump, 2002).

Ishihara und Mitarb. untersuchten die Lipooxygenase (LOX) Aktivität an der Mausmastzelllinie MC/9. Diese Zellen produzierten LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> und 5-HETE nach der Zugabe von AA. Die Supplementierung des Mediums mit EPA oder DHA hemmte dagegen die Bildung dieser Lipidmediatoren (Ishihara et al., 1998).

Die Haupthistokompatibilitätskomplexe (HLA) HLA-DR und HLA-DP sind ein weiterer Angriffspunkt von Fettsäuren auf die Genexpression. So konnten Hughes und Mitarb. eine verminderte Expression der HLAs auf Monozyten von Menschen, die eine fischölsreiche Diät erhielten, finden. HLAs spielen eine wichtige Rolle in der humoralen und zellvermittelten Immunantwort (Hughes et al., 1996).

Eine verringerte Antigenpräsentation und T-Zellaktivität sowie eine verringerte entzündungsfördernde Zytokinexpression in der Haut sind somit vermutlich die Gründe für eine reduzierte klinische Symptomatik nach Fettsäuregabe bei CAD (Müller et al., 2004; Müller et al., 2005a) und immunologischen Dysregulationen (Arthritis, autoimmune Nephritis, Psoriasis, ulzerative Kolitis) (Chandra, 1989).

### 2.1.3.5.6. Eicosanoide

Als Eicosanoide (griech. Eicosa = 20) wird eine Gruppe von hydrophoben hormonähnlichen Substanzen bezeichnet, die als Immunmodulatoren und Neurotransmitter wirken und an entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt sind. Aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren kann in den meisten Geweben eine Vielzahl von Lipidmediatoren oder Eicosanoiden (Prostaglandine, Prostazykline, Leukotriene, Thromboxane und Fettsäurenhydroxide) gebildet werden. In Abhängigkeit von der als Substrat genutzten Fettsäure entstehen so unterschiedlich wirksame Mediatoren. Dabei stellt Arachidonsäure das wichtigste Substrat dar, da sie eine der am häufigsten vorkommenden Fettsäuren ist (Ziboh et al., 2000). Die aus AA gebildeten Mediatoren wirken u.a. entzündungsfördernd. Für die Bildung der Lipidmediatoren ist eine Abspaltung der Fettsäuren von den Membranphospholipiden notwendig, was mit Hilfe der Phospholipasen geschieht (Smith, 1992). Die gebildeten Mediatoren sind sehr kurzlebig und vermitteln ihre Effekte über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Plasmamembran. Die freien Fettsäuren können durch drei verschiedene Enzymsysteme in ihre wirksamen Metabolite umgewandelt werden (Smith, 1989). So entstehen durch die Prostaglandin H Synthase oder Zyklooxygenase die Prostaglandine und Thromboxane. Über den Lipoxygenaseweg werden die Leukotriene und Fettsäurenhydroxide gebildet und mittels der Zytochrom P450-Epoxygenase entstehen Fettsäurenepoxide.

Indem sie eine Zunahme an entzündungshemmenden Eicosanoiden und eine Abnahme an entzündungsfördernden Entzündungsmediatoren bewirken, können Fettsäuren zu einer Minderung der Hautentzündung beitragen. Die Synthese von Lipidmediatoren wurde bisher besonders an isolierten Endothelzellen untersucht. Diese bilden aus AA  $PGI_2$  und geringe Mengen  $PGE_2$ . Die Bildung dieser Prostaglandine konnte in vielen untersuchten Endothelzellkulturen durch eine EPA-Zugabe zum Kulturmedium gesenkt werden (Spector et al., 1983; Croset et al., 1999). Eine Hemmung der  $PGI_2$ - und  $PGE_2$ -Synthese konnte auch durch eine Zugabe von  $\alpha$ -Linolensäure und DHA bewirkt werden, während die Zugabe von LA und AA keine Effekte auf die PG-Produktion hatte (Yerram et al., 1989). Auch durch eine Zugabe der Fettsäuren ETA und Adrensäure konnte eine  $PGI_2$  Hemmung an kultivierten Endothelzellen beobachtet werden (Mann et al., 1986; Croset et al., 1999). Verschiedene Studien berichten von positiven Effekten durch die Verabreichung von essentiellen Fettsäuren auf die Konzentration von Leukotrienen

bei Menschen (Wright und Burton, 1982; Gimenez-Arnau et al., 1997). In der Humanmedizin können auch Leukotrien-Inhibitoren therapeutisch eingesetzt werden (Carucci et al., 1998; Marsella, 2001). Vergleichende Untersuchungen bei Hunden konnte bislang jedoch keine deutlichen Konzentrationsunterschied der Leukotriene bei erkrankten im Vergleich zu gesunden Hunden nachweisen (Müller-Plettenberg, 1989). Klinisch konnten nur geringe oder keine positiven Effekte von Leukotrieninhibitoren gezeigt werden, weshalb diese nicht als Therapeutika empfohlen werden (Olivry und Müller, 2003).

Fischöl enthält die Omega-3-Fettsäure EPA. Durch die Fütterung von Fischöl wird EPA anstelle von AA in die Zellmembran eingebaut, was wiederum zu einer verminderten Produktion an proinflammatorischen Entzündungsmediatoren führt. EPA kann zusätzlich durch die Enzyme 5-LOX und COX zu entzündungshemmenden Eicosanoiden abgebaut werden.

Zwei tiermedizinische Arbeiten untersuchten Hunde, die eine Diät mit einem erniedrigten Omega-6:Omega-3-Fettsäuren-Verhältnis und einem höheren Gehalt an Omega-3-Fettsäuren erhielten (Vaughn et al., 1994; Bryne et al., 2000). In diesen Studien konnte eine verminderte Konzentration und Produktion von epidermalem Leukotrien B<sub>4</sub> beobachtet werden. LTB<sub>4</sub> wird in der Epidermis von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten aus AA synthetisiert und gehört zu den proinflammatorischen Eicosanoiden. Patienten mit AD weisen oft eine hohe Konzentration an LTB<sub>4</sub> in der Haut auf (Ruzicka et al., 1986). LTB<sub>4</sub> bewirkt einen stark ausgeprägten chemotaktischen Reiz auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten (Strom und Thomsen, 1990). Es wird vermutet, dass die beschriebenen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub> in der Haut eine Entzündungsreaktion initiieren und T-Helferzellen vermehrt gebildet werden (Ruzicka et al., 1986; Ruzicka, 1989). Jedoch ist die Rolle von LTB<sub>4</sub> bei der CAD nach Olivry und Mitarb. weiterhin umstritten (Olivry et al., 2001c). Fürst und Kuhn empfehlen aufgrund der Wirksamkeit von FS über Lipidmediatoren auf das Immunsystem und im Entzündungsgeschehen ein Verhältnis von n6- zu n3-Fettsäuren in der Nahrung von 2-2,5 zu 1 (Fürst und Kuhn, 2000). Menschen sollten 1-2% der täglichen Energiemenge als LA und 0,2-0,5% der täglichen Energiemenge als  $\alpha$ -Linolensäure aufnehmen (Sardesai, 1992a; Stanner, 2000). Simopoulos und Mitarb. empfehlen eine tägliche Aufnahme von 4,44 g (2%) LA und 2,22 g (1%)  $\alpha$ -Linolensäure sowie je 0,22 g (0,1%) EPA und DHA (Simopoulos et al., 1999).

### 2.1.3.5.7. Fettsäuren als Therapie

Die ersten Berichte über die Therapie der CAD mit essentiellen Fettsäuren stammen von 1987 (Bjorneboe et al., 1987). Zahlreiche Studien konnten seitdem die Wirksamkeit von Fettsäuren zur Reduktion von Juckreiz und Entzündungen nachweisen (Scott et al., 2001; Müller et al., 2004). Aufgrund der Ergebnisse der Studie von Müller und Mitarb. lässt sich vermuten, dass neben der effektiven Dosis, der Aufnahmemenge und dem Omega 6:Omega-3-Verhältnis weitere Faktoren an der Wirkung von essentiellen Fettsäuren beteiligt sind. Durch die orale Gabe verschiedener Fettsäuren konnten der Atopie-assoziierte Juckreiz und die Entzündungssymptome bei Hunden gemindert werden (Bond und Lloyd, 1992; Scott et al., 1992; Logas und Kunkle, 1994). Deshalb wird eine Supplementierung von Omega-6-Fettsäuren (GLA) (Scarff und Lloyd, 1992), von Kombinationen aus GLA und Omega-3-Fettsäuren (EPA und DHA) (Bond und Lloyd, 1992; Scott et al., 1992; Scott et al., 2001), variablen Dosen an Omega-3 Fettsäuren (Logas und Kunkle, 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.

Die Therapie mit Fettsäuren und anderen Medikamenten ist facettenreich und muss auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass, sollte ein Produkt keine Wirkung zeigen, Versuche mit unterschiedlichen Produkten/Medikamenten durchaus sinnvoll sind (Scott et al., 1992; Scott et al., 2001). Eine Kombination mit einem Antihistaminikum kann synergistisch wirken (Paradis et al., 1991; Paterson, 1995). Positive Effekte wurden auch bei einer Kombinationstherapie mit Glukokortikoiden beschrieben (Scott et al., 2001; Saevik et al., 2004).

Nebenwirkungen werden selten mit einer FS-Supplementierung assoziiert, gelegentlich kann jedoch reversibler Durchfall auftreten. In vereinzelt Fällen konnte das Auftreten einer Pankreatitis nach Behandlung mit Fettsäuren beobachtet werden (Scott et al., 2001).

#### **2.1.4. Ziel der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Gabe essentieller Fettsäuren auf die Zahl der Entzündungszellen in der Haut atopischer Hunde auswirkt. Dazu wurden vor und nach der Gabe zweier Fettsäurepräparate und eines Placebos Hautbiopsiestanzen entnommen und diese histologisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Zellzählungen wurden im Anschluss mit den klinischen Befunden korreliert.

### III Material und Methoden

#### 3.1. Einschlusskriterien für die Hunde in die Studie

Insgesamt 28 Hunde aus dem Patientengut sowie von Studenten und Angestellten des Veterinary Teaching Hospital der Colorado State Universität, USA wurden während des Frühjahrs und Sommers 2001 in die Studie aufgenommen. Das Protokoll der Studie wurde durch das Animal Care and Use Committee der Colorado State Universität geprüft und bewilligt (Welfare Assurance Nummer A3572-01).

Die Diagnose atopische Dermatitis wurde auf Grund des Vorberichtes, des klinischen Erscheinungsbildes, dem Ausschluss von Differentialdiagnosen wie zum Beispiel der Flohbiss- und Futtermittelallergie sowie des Milbenbefalles durch entsprechende Test- und Nachweisverfahren gestellt (DeBoer und Hillier, 2001). Zusätzlich wurden die auslösenden Allergene über einen Intrakutan- oder Serum-IgE-Allergentest ermittelt (Hillier und DeBoer, 2001).

#### 3.2. Anamnestische Patientendaten

##### 3.2.1. Altersverteilung

Das Alter der Hunde variierte bei Erstvorstellung zwischen 1 und 10 Jahren. Der Altersdurchschnitt betrug 5 Jahre (Median 5,28). Die Details der Altersverteilung sind Abbildung III-1 zu entnehmen.

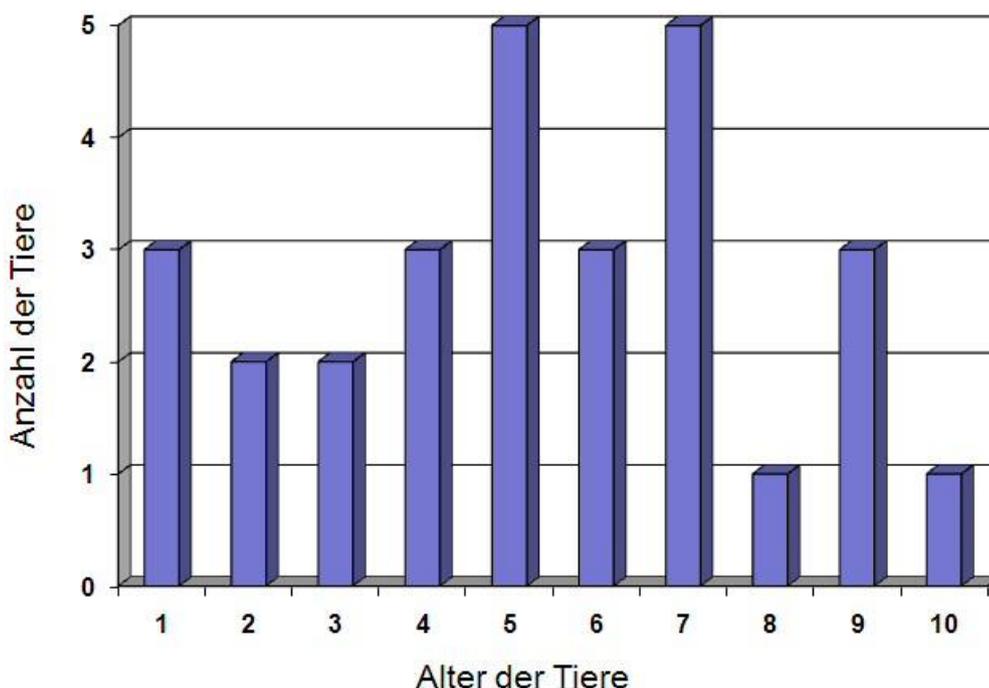


Abbildung III-1:  
Altersverteilung der  
teilnehmenden Hunde

### 3.2.2. Geschlechtsverteilung

Unter den Studienteilnehmern überwogen die männlichen (n=21) gegenüber den weiblichen Tiere (n=7). Sieben der weiblichen Tiere und 18 der männlichen Tiere waren kastriert.

### 3.2.3. Gruppenverteilung und Fettsäuregabe

Die Hunde wurden mit Hilfe einer Tabelle zufällig verteilter Nummern durch einfache Randomisierung einer von drei Gruppen zugeteilt. Tiere der **Gruppe 1 (LO)** (n=11) erhielt Leinöl Kapseln (Flaxseed oil capsules, Traco Labs, Champaign; Illinois, USA), die pro 1000mg Kapsel 570 mg  $\alpha$ -Linolsäure (ALA; n-3) und 170 mg LA (n-6) enthalten. Die Dosis wurde auf 200 mg/kg Körpergewicht (KG) festgesetzt. Das entspricht einer Einnahme von 114 mg ALA/kg KG und 34 mg LA/kg KG.

Die Tiere der **Gruppe 2 (KP)** (n=9) erhielten ein kommerziell erhältliches Produkt (3V Caps, DVM Pharmaceuticals, Miami, Florida, USA) aus Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) mit der folgenden Dosierung: EPA 250mg/Kapsel; 50mg/kg KG und DHA 116mg/ Kapsel; 33mg/kg KG.

Die Hunde der **Gruppe 3 (PB)** (n=8) erhielt 200 mg/kg KG eines Placebos (Paraffin Oil, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

## 3.3. Studienprotokoll

Die Tiere wurden für die Dauer von 10 Wochen supplementiert. Weder die Besitzer noch die behandelnden Tierärzte wussten, welcher der drei Gruppen die Tiere zugehörig waren. Anhand eines Fragebogens bewerteten Tierärzte und Besitzer mittels einer Punktebewertung den Juckreiz und die auftretenden Hautveränderungen vor und nach der Behandlung (siehe 9.11.2). Der Juckreiz wurde anhand einer visuellen Analogskala von 0-30 ausgewertet, das linke Ende der nicht-skalierten Linie (0) stand für Abwesenheit von Juckreiz, das rechte Ende (30) für ständigen und schweren Juckreiz. Für die Ermittlung der klinischen Scores wurden drei Läsionstypen (Erythem, Papeln und Krusten) von 0 (abwesend) bis 4,5 (hochgradig) bewertet und deren einzelne Scores addiert. Eine Übersicht aller ermittelten Scores ist dem Anhang zu entnehmen (siehe 9.9).

### 3.4. Biopsieprobenentnahme

Jedem Tier wurde eine Hautstanzbiopsie unmittelbar vor und nach der zehnwöchigen Fettsäure- bzw. Plazebosubstitution entnommen. Die Proben wurden bei allen Tieren im Bereich des lateralen Thorax genommen, wobei darauf geachtet wurde, stark veränderte Hautareale nicht zu biopsieren. Die Haut wurde lokal mit 2%igem Lidocainhydrochlorid (Lidocaine hydrochloride, Fujisawa, Deerfield, Illinois, USA) anästhesiert. Für die Durchführung der Hautstanzen wurden sterile Biopsiestanzen mit einem Durchmesser von sechs Millimetern (Disposable biopsy punch, Stiefel Laboratories, Coral Gables, Florida, USA) verwendet.

### 3.5. Fixation

Die Hautbiopsien wurden sofort nach der Entnahme in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd (SAV 25000-4-1, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken SAV) verbracht und dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.6. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgte nach folgendem Schema maschinell in einem Einbettungsautomaten (Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau):

Spülen mit Aqua dest.:	30 Minuten
Ethanol 70 %:	2 x 1,5 Stunden
Ethanol 96 %:	2 x 1,5 Stunden
Ethanol 100 %:	2 x 1,5 Stunden
Xylol (Intermedium):	2 x 30 Minuten
Xylol:	1,5 Stunden
Paraffin bei 60°C:	2 Stunden
Paraffin bei 60°C:	3 Stunden

Danach wurden die Gewebeproben ausgegossen und Paraffinblöcke an einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite Medizintechnik, Burgdorf) hergestellt. Von den Blöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms

(HM 315, Microm, Walldorf) ca. 4 – 6 µm dicke Schnitte gefertigt, diese dann auf einem 40°C warmen Wasserbad (Daglef Platz, Wankendorf) gestreckt und auf geschliffene Objektträger (76x26 mm, VWR International, Darmstadt) aufgezogen. Im Anschluss trockneten die Schnitte für mindestens 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach).

### 3.7. Färbung der Paraffinschnitte

Vor dem Färben wurde das Paraffin mittels Xylol (Isomerengemisch, SAV LP, Flintsbach am Inn) aus den Schnitten entfernt. Dazu wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol verbracht. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, Aqua dest..

#### 3.7.1. Hämalau-Eosin-Färbung

In dieser Routinefärbung wurden die Schnitte auf allgemeine pathomorphologische Merkmale hin ausgewertet.

Mayers Hämalau (AppliChem A0884)	4 Minuten
Wässern in fließendem Leitungswasser	5 Minuten
Eosin 1% (siehe 9.3.4)	ca. 2 Sekunden
Aqua dest. Spülung	3 Sekunden
Dehydrierung: Aqua dest.:	1 Sekunde
Ethanol 70 %:	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %:	2 x 1 Sekunde
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch, s.o.):	insgesamt 1 Minute

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe) eingedeckt.

### 3.7.2. Giemsa Färbung

In der Färbung nach Giemsa färben sich Zellkerne unterschiedlich blau, eosinophile Granula (z.B. in eosinophilen Granulozyten) rot und Mastzellgranula rotviolett. Mastzellen und Bakterien lassen sich durch diese Färbung besonders gut darstellen.

Giemsa Gebrauchslösung (siehe 9.3.2) bei 65°C:	1 Stunde
Aqua dest. Spülung:	3 Sekunden
Differenzierung in Essigsäure 0,5% (siehe 9.3.3)	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 Sekunden
2 x Ethanol 100 %:	Je 2 Sekunden
Dehydrierung: Aqua dest.:	1 Sekunde
Ethanol 70 %:	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %:	2 x 1 Sekunde
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch, s.o.):	Insgesamt 1 Minute

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe) eingedeckt.

### 3.7.3. Luna Färbung

Die Luna-Färbung ist gut geeignet, um eosinophile Granulozyten bzw. deren Granula darzustellen. Die Färbelösung wurde nach dem Manual of Histologic Staining Methods des Armed Forces Institute of Pathology hergestellt (Luna, 1968).

Direkt vor der Färbung wurde eine Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung (WEHG) (siehe 9.3.5) und im Anschluss eine Biebrich-Scharlach-Lösung (BSL) hergestellt. Durch Mischen der beiden Lösungen (180 ml WEGH mit 20 ml BSL) entstand die gebrauchsfertige Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung (HBSG).

Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung (siehe 9.3.5):	5 Minuten
Differenzierung in 1%iger saurer Etanollösung	8 x 1 Sekunde

(siehe 9.3.6) bis die Kerne sich gut darstellen:

Abspülen mit Leitungswasser	1 Minute
(zum Entfernen des sauren Ethanol):	
0,5 % Lithium-Karbonat-Lösung (siehe 9.3.7)	5 x 1 Sekunde
(bis zum Farbumschlag nach blau):	
Abspülen unter fließendem Wasser:	2 Minuten
Dehydrierung: Aqua dest.:	1 Sekunde
Ethanol 70 %	1 Sekunde
Ethanol 96 %	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %	2 x 1 Sekunde
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch, s.o.):	Insgesamt 1 Minute

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe) eingedeckt.

### 3.8. Immunhistochemie

#### 3.8.1. Allgemeines zur Methodik

Als Immunhistochemie (IHC), die in der Literatur auch Immunhistologie oder Immun- bzw. Antikörperfärbung genannt wird, wird in der Medizin und Biologie eine Methode bezeichnet, mittels derer Antigene anhand von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Für Antikörperfärbungen wird fixiertes Gewebe verwendet, beispielsweise Mikrotomschnitte von Organen. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop des Antigens. Der markierte Antikörper wird vom Antigen gebunden und dann farblich dargestellt. Bei der indirekten Methode wird in einem ersten Schritt ein spezifischer Antikörper, auch Primärantikörper genannt, auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Im nächsten Schritt wird ein sogenannter Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen die Immunglobuline des Primärantikörpers richtet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und löst durch eine Enzym-Substrat-Reaktion die Farbentstehung am Ort des Antigens aus.

Die immunhistochemischen Methoden sollten zum quantitativen Nachweis der Lymphozytensubpopulationen in den zu untersuchenden Hautbiopsien eingesetzt

werden. Dabei sollte der polyklonale anti-CD3-Antikörper (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Kat-Nr. A045201) aus dem Kaninchen in der vorliegenden Arbeit dem Nachweis von T-Zellen dienen. Dieser Antikörper richtet sich gegen ein intrazytoplasmatisches Epitop der  $\epsilon$ -Kette des CD3-Komplexes (Mason et al., 1989). B-Zellen sollten mit Hilfe eines Oberflächenantikörpers gegen das CD20 Molekül (LABVISION, Fremont CA, USA, Kat-Nr. RB-90 13-PO) nachgewiesen werden. CD20 ist ein 33kDa großes Antigen der B-Lymphozyten, das aus vier transmembranösen Regionen und zytoplasmatischen N- und C-Termini besteht. Der Antikörper stammte ebenfalls aus dem Kaninchen.

Methodisch wurden die Gewebeproben zunächst mit dem primären unkonjugierten Antikörper beschichtet. Hierauf folgt der unkonjugierte Sekundärantikörper, auch Brückenantikörper genannt. Primärantikörper sowie Antikörper des Enzym-Immunkomplexes sollten aus derselben Spezies stammen, damit der Sekundärantikörper sie miteinander verbinden kann. Dabei muss der Brückenantikörper zwei Anforderungen erfüllen: er muss gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper, als auch die im Immunkomplex gebundenen Antikörper stammen; er muss im Überschuss vorliegen, damit einer der beiden Fab-Arme an den Primärantikörper bindet und der andere für den Antikörper aus dem Enzym-Immunkomplex zur Verfügung steht (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Zur Sichtbarmachung der Antikörperbindung wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) nach Angaben des Herstellers verwendet (Hsu et al., 1981).

### **3.8.2. Durchführung**

Nach Einbettung in Paraffin und Herstellung der Schnitte unter Verwendung silanisierter Objektträger (76x26 mm, StarFrost, VWR International, Darmstadt), wurden die Schnitte in Xylol (Isomerengemisch, SAV LP, Flintsbach am Inn) entparaffinisiert (2 x 10 Minuten). Im Anschluss folgte die Rehydrierung durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, Aqua dest.) und das Demaskieren der Schnitte (Mikrowelle: 10mM Citratpuffer pH 6,0 bei 700 Watt für 2 x 10 Minuten).

Die immunhistologische Reaktion für die Primärantikörper gegen CD3 und CD20 wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 1%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 Minuten
Spülen in TBS (0,05 M, pH 7,6) (siehe 9.3.9)	10 Minuten
Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe mit Ziegennormalserum, 1:10 verdünnt mit TBS	30 Minuten, feuchte Kammer bei RT
Inkubation mit dem Primärantikörper (Rb anti-CD3, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Nr. A045201 bzw. RB anti-CD20, LABVISION, Fremont CA, USA, Kat-Nr. RB-90 13-PO), 1:100 verdünnt mit TBS	1 Stunde, RT
Spülen in TBS	10 Minuten
Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-IgG, VECTOR: BA-1000, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim), 1:200 verdünnt mit TBS	1 Stunde, feuchte Kammer bei RT
Spülen in TBS	10 Minuten
Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim), 1:100 verdünnt mit TBS	30 Minuten, feuchte Kammer bei RT
Spülen in TBS	10 Minuten
Chromogenreaktion mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DAB-Lösung (Bio Trend, Nr. 4170, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln)	5 Minuten
Spülen in fließendem Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärben mit Mayers Hämalaun (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0884)	1 Minute
Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 Minuten
Entwässern: Aqua dest.	1 Sekunde
Ethanol 70 %	1 Sekunde
Ethanol 96 %	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %	2 x 1 Sekunde
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch, s.o.)	Insgesamt 1 Minute

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe) eingedeckt.

Die immunhistochemischen Färbungen erbrachten nur sehr inkonsistente Färbeergebnisse. Dies könnte auf eine lange Lagerung der Proben in Formaldehyd (FD) zurückzuführen sein. Formaldehydfixierung gilt als der Goldstandard für die Routinehistologie und die Immunhistochemie. Formaldehyde fixieren und konservieren vor allem Peptide und die generelle Struktur von Zellorganellen. Sie interagieren auch mit Nukleinsäuren, haben jedoch wenig Einfluss auf Kohlenhydrate (Eltoum et al., 2001). In kalziumhaltigem Gewebe stellt FD ein gutes Fixativ für Lipide dar (Jones, 2002). In Lösung ist es in der Lage, die folgenden Aminosäuren zu binden: Lysin, Tyrosin, Asparagin, Histidin, Arginin, Cystein und Glutamin (Shi et al., 2000). Der zu Grunde liegende Mechanismus der Gewebefixierung mit FD ist die Formation von Additionsprodukten (reaktive Hydroxymethylbindung) zwischen dem Formalin und ungeladenen reaktiven Aminosäuregruppen (-NH oder NH<sub>2</sub>) und der anschließenden Ausbildung von Brückenbindungen (Dapson, 1993). So formt die Hydroxymethylgruppe in der Anwesenheit eines zweiten reaktiven Hydrogens eine Methylenbrücke. Das endgültige Ergebnis einer FD-Fixierung ist die Konformationsänderung von Makromolekülen, die die Erkennung von Proteinen (Antigenen) durch Antikörper erschwert bzw. unmöglich macht (Montero, 2003). Diese Veränderungen modifizieren die dreidimensionale (Tertiär- und Quartär-) Struktur von Proteinen, während die Primär- und Sekundärstruktur nur wenig beeinträchtigt wird (Mason und O'Leary, 1991; Hayat, 2002c). Aus diesem Grund muss bei ca. 85% der in Formalin fixierten Antigene ein sog. Antigen-Retrieval (auch Demaskierung) durchgeführt werden, um die Blockierung der sichtbarzumachenden Antigene aufzuheben. Die Fixation in Formalin ist ein progressiver, zeit- und temperaturabhängiger Vorgang und eine zu lange Fixierung kann durch eine Beeinflussung des Antigen-Retrievals zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen der IHC führen (Hayat, 2002c; Taylor et al., 2002; Ramos-Vara, 2005; Oyama et al., 2007). Eine lange Spülung von formalinfixiertem Material unter fließendem Leitungswasser reduziert eine weitere Fixation durch die Beseitigung von ungebundenem Formalin (Hayat, 2002c), bereits bestehende Brückenbindungen können jedoch nicht aufgehoben werden (Eltoum et al., 2001). Auch verhindert eine Langzeitlagerung von formalinfixiertem Material in Alkohol die Formation weiterer Brückenbindungen und kann dadurch einen positiven Effekt auf die Antigen-detektion

haben. Die Folgen einer zu langen Fixierung können auch teilweise durch das Einweichen des Gewebes in einer konzentrierten Ammoniaklösung unter Zugabe von 20%igem Chloralhydrat rückgängig gemacht werden (Lhotka und Ferreira, 1949). Da das Gewebe für diese Studie bereits in Form von Paraffinblöcken vorlag, war es nicht möglich, eine der oben beschriebenen Behandlungen zur Verbesserung der IHC Ergebnisse durchzuführen.

Zu den möglichen Antigen-Retrieval Methoden gehören vor allem enzymatische und hitzebasierte Methoden, wobei die Hitzebehandlung in der Mikrowelle und die Proteasenvorbehandlung die gebräuchlichsten Methoden darstellen (Ramos-Vara, 2005). Fraenkel-Conrat und Mitarb. konnten zeigen, dass die chemischen Reaktionen zwischen Proteinen und Formalin zumindest teilweise durch eine hohe Temperatur oder eine alkalische Hydrolyse rückgängig gemacht werden können (Fraenkel-Conrat et al., 1947; Fraenkel-Conrat und Olcott, 1948a, b). Die genauen Mechanismen der Hitzebehandlung sind nicht geklärt, es gibt jedoch verschiedene Erklärungsansätze. So wird eine Demaskierung der Epitope z.B. auf eine Hydrolyse der Methylenbrücken zurückgeführt (Van Hecke, 2002). Es müssen jedoch auch andere Faktoren eine Rolle spielen, da eine Hitzebehandlung auch positive Einflüsse auf die IHC von ethanolfixiertem Gewebe hat, in dem es nicht zur Ausbildung von Brückenbindungen kommt (Hayat, 2002a). Andere Hypothesen beinhalten eine mögliche Extraktion diffusionsfähiger blockierender Proteine, die Abscheidung von Proteinen und eine verbesserte Penetration der Antikörper durch eine Rehydrierung des Gewebes (Sompuran et al., 2004). Temperaturen von 100°C für einen Zeitraum von ca. 10 min erzielen im Vergleich zu einer Behandlung mit niedrigeren Temperaturen über einen längeren Zeitraum bessere Ergebnisse (Hayat, 2002b). Zufriedenstellende Ergebnisse können jedoch auch durch eine 20 minütige Inkubation in einem Dampfdrucktopf (90-95°C) erreicht werden.

Eine universelle Lösung zur Nutzung bei der Hitzebehandlung ist nicht vorhanden. Daher finden verschiedene Lösungen auf der Basis unterschiedlicher Puffer (z.B. Citrat- oder TRIS-Puffer) bei unterschiedlicher pH-Wert Einstellung (3-10) Anwendung (Imam et al., 1995; Hayat, 2002b).

Die Proteasewirkung beruht auf der Spaltung von Proteinquervernetzungen. Auch können dadurch blockierende Proteine entfernt werden. Die Proteolysezeit korreliert häufig mit der Fixierungsdauer, weshalb eine exakte Fixierung Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist. Zur Anwendung gelangen verschiedene Proteasen

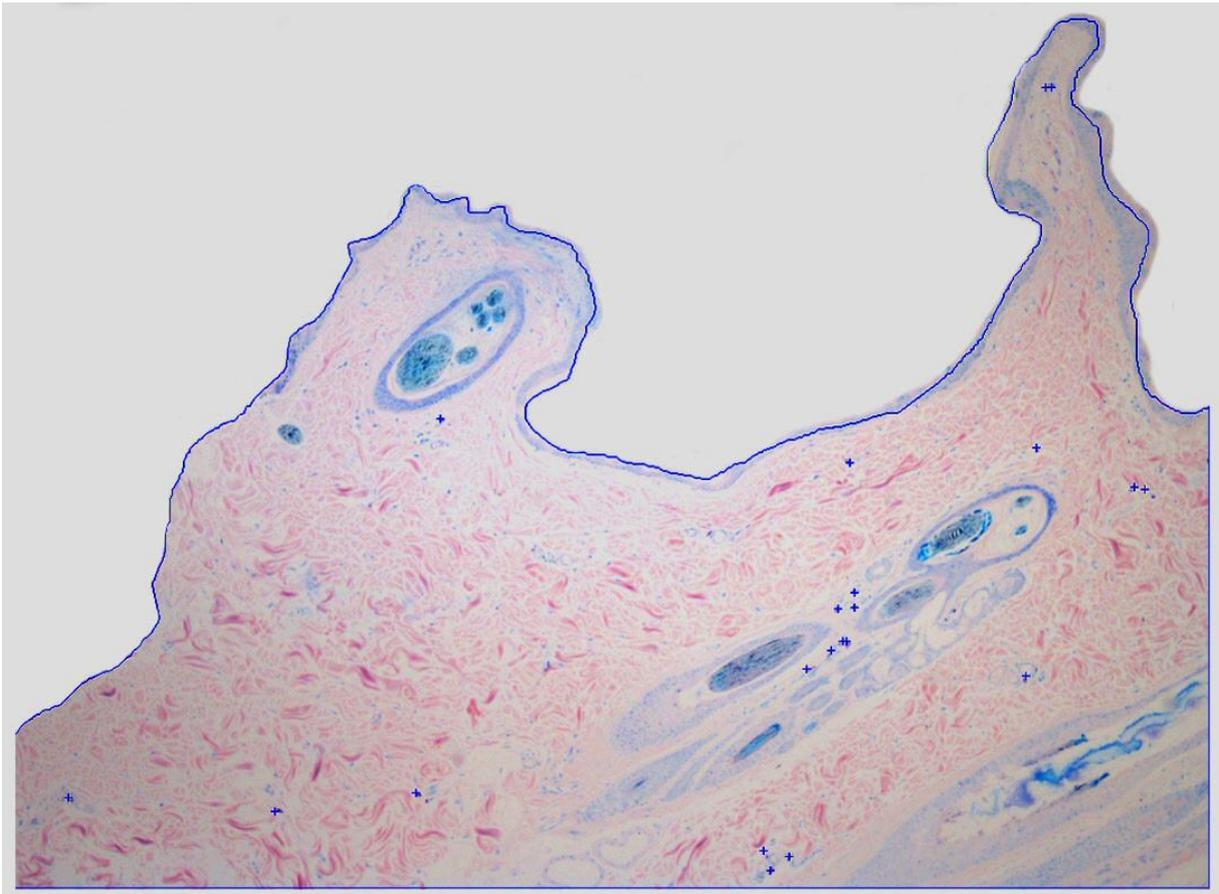
wie Pronase, Trypsin, Papain, Pepsin oder ProteinaseK. Enzymkonzentration, Einwirkungsdauer und Eigenschaften des nachzuweisenden Antigens müssen aufeinander abgestimmt werden. Bei inadäquater Verwendung von Proteasen kann es aber auch zur Verminderung der Immunreaktivität und zu einer oft beträchtlichen Gewebeschädigung kommen.

Trotz der Ausführung verschiedener empfohlener Behandlungsprotokolle (verschiedene Erwärmungsmethoden in Puffer wie Autoklavieren, 37°C warmes Wasserbad, und Mikrowellenbehandlung bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen) (Shi et al., 1991; Shi et al., 1995; Shi et al., 1997; Shi et al., 2000) konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erbracht werden.

Aus diesem Grund wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte letztendlich nicht verwendet.

### **3.9. Bestimmung der Zellzahlen**

Alle Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht und mit Hilfe der Software analySIS FIVE (Image Analysis Software analySIS FIVE, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) ausgewertet. Aus den zwei auf dem Objektträger befindlichen Anteilen der Hautstanzen wurde je ein repräsentativer Anteil ausgewählt, mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (ColorView III, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) in zwanzigfacher Vergrößerung fotografiert und im analySIS Programm dokumentiert. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst den jeweils gleichen Anschnitt in den unterschiedlichen gefärbten Schnitten auszuwerten (siehe Abbildung III-2).



**Abbildung III-2: E2503-56001-47, Epidermis und Dermis mit Gefäßen und Adnexen.**

(Screenshot) Die Fläche wurde umfahren (blaue Linie) und die Mastzellen mit blauen Kreuzen markiert.

Die Fläche des Schnittes wurde mittels analySIS FIVE in  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Durch ein Markieren der Zellen wurde die Zahl der Mastzellen in jeweils zwei Giemsa gefärbten Schnitten pro Biopsieprobe und die der eosinophilen Granulozyten in jeweils einem nach Luna gefärbten Schnitt pro Biopsieprobe bestimmt. Wenn nötig wurden dazu 40- und 80fache Vergrößerungen herangezogen. Nach Ende der Auszählung wurde mit Hilfe des Programms analySIS FIVE die Summe der gezählten Zellen ermittelt. Die Fläche des Schnittes und die gemessene Zellzahl wurden in eine Microsoft Excel Tabelle übertragen und NA (Number of profiles per area), die Zellzahl/Fläche ( $\text{mm}^2$ ) berechnet (Gundersen et al., 1989):

$$\text{NA} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Fläche}} \quad (\text{dimensionslos})$$

### 3.10. Bestimmung des Variationskoeffizienten

Der Variationskoeffizient (CV) ist definiert als die relative Standardabweichung (SD), d.h. die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert einer Zufallsvariablen. Er eignet sich, um die innerhalb einer Probe auftretende Varianz zu ermitteln. Die Motivation für diesen Kennwert ist, dass eine Zufallsvariable mit großem Mittelwert im Allgemeinen eine größere Varianz aufweist als eine mit einem kleinen Mittelwert. Da die Varianz und damit die Wurzel daraus, die Standardabweichung, nicht normiert sind, kann daher im Allgemeinen nicht beurteilt werden, ob eine Varianz groß oder klein ist. Der Variationskoeffizient hingegen stellt eine Art Normierung der Varianz dar. Das bedeutet insbesondere: ist die Standardabweichung größer als der Mittelwert, so ist der Variationskoeffizient größer 1. In biologischen Proben sollte der CV unter einem Wert von 20% liegen (Gundersen, 1984; Reed et al., 2002). Der CV wurde wie folgt berechnet und in % angegeben:

$$CV(x) = \frac{SD(x)}{\bar{x}} \times 100$$

SD= Standardabweichung

$\bar{x}$  = Mittelwert

In der vorliegenden Arbeit wurde der CV für NA der Mastzellzellen bestimmt. Dazu wurden der jeweils erste brauchbare Schnitt eines Blockes (Schnitt x) und der jeweils zwölfte darauffolgende Schnitt (Schnitt x+12) ausgewertet. Die verwendeten NA-Werte wurde bestimmt, indem für jede ausgewertete Probe die Differenz der Summe der Zellzahlen aus Schnitt x und x+12 und der Summe der Flächen der beiden Schnitte gebildet wurde.

### 3.11. Statistische Berechnungen

Die dermalen Zellzahlwerte (NA) der drei Gruppen (LO, KP und PB) wurden mittels eines Kruskal-Wallis nonparametrischen One-way Analysis of Variance (ANOVA) Tests verglichen. Dunn`s Post Test wurde genutzt, um die Werte gepaarter Gruppen zu analysieren. Ein p-Wert unter 0,05 wurde hierbei als signifikant angesehen.

Korrelationen zwischen den klinischen (läsionalen) Scores und den von den Besitzern ermittelten Pruritus Scores sowie der Mastzellzahlen wurden anhand des Pearsons Korrelationstests evaluiert. Für die Korrelationen zwischen den klinischen Scores und den Pruritus Scores sowie den Zahlen der eosinophilen Granulozyten wurde der nichtparametrischer Spearman Korrelationstest verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Graphpad Prism 5.0 und der InStat 3.06 Software (Fa. Graphpad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

## IV Ergebnisse

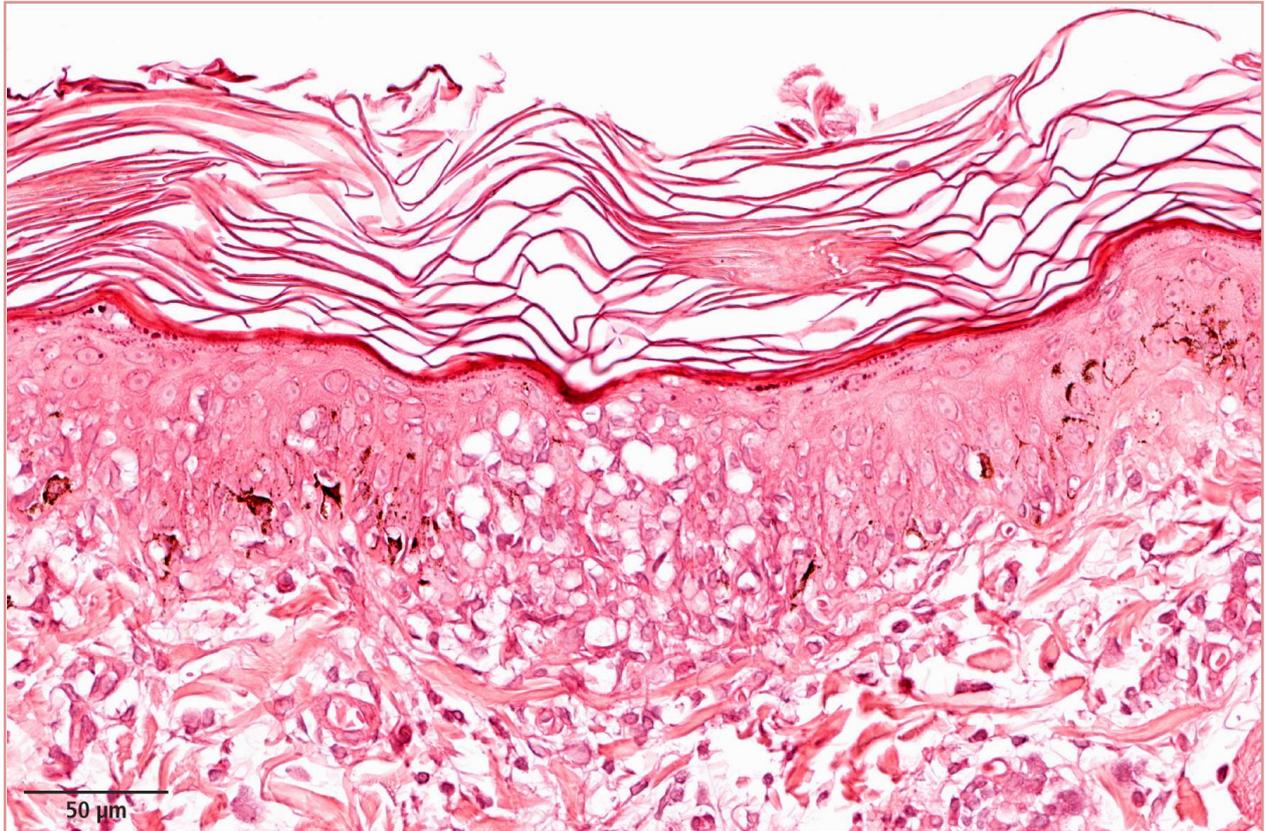
### 4.1. Histopathologische Befunde

Die histopathologischen Veränderungen in den untersuchten Biopsien wurden als akute bis subakute Veränderungen gewertet. Insgesamt 82% der Biopsien (23/28) zeigten eine gering- bis mittelgradige überwiegend orthokeratotische, teils kompakte, teils korbgeflechtartige Hyperkeratose (siehe Abbildung IV-1).



**Abbildung IV-1: E2503-56001-7, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E.**  
Mittelgradige korbgeflechtartige orthokeratotische Hyperkeratose.

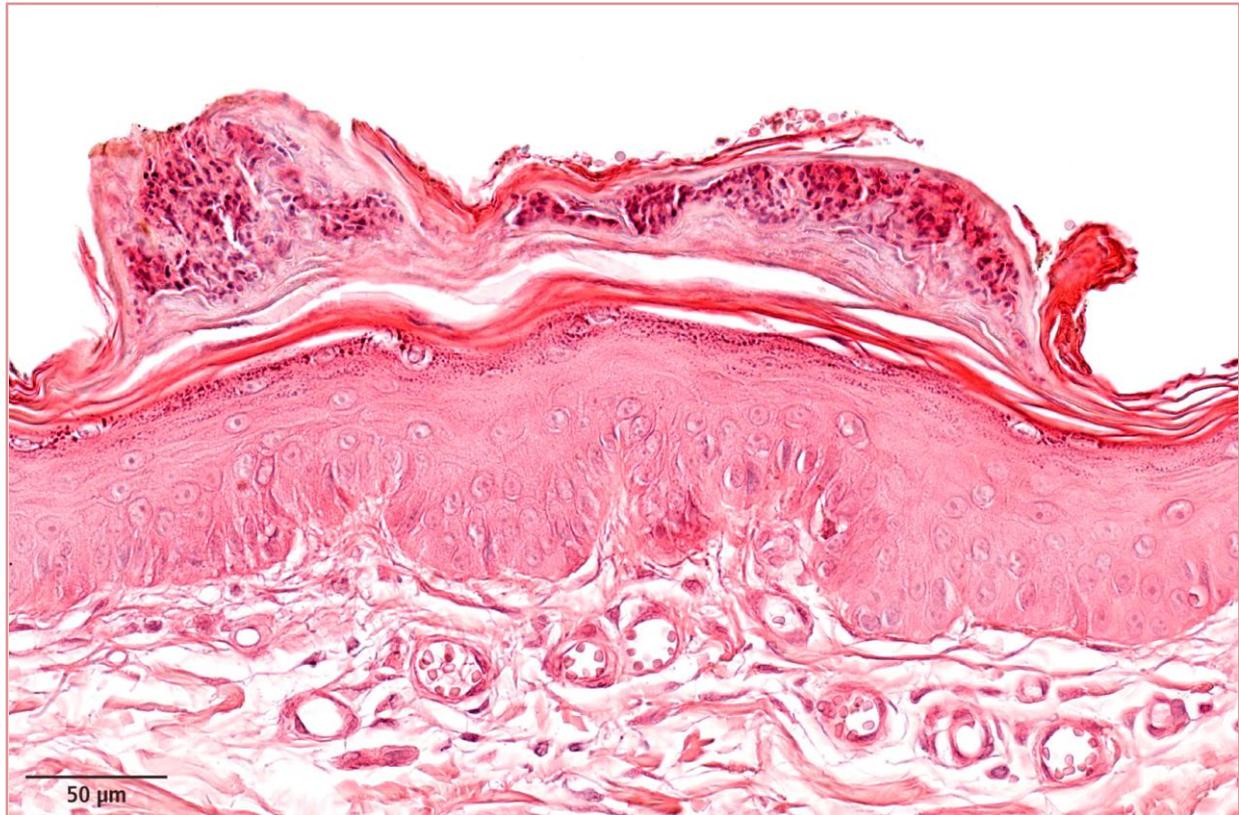
Die Epidermis aller Proben wies eine diffuse und irreguläre gering- bis mittelgradige Hyperplasie auf. Eine fokale bis multifokale gering- bis hochgradige epidermale Spongiose konnte in 9/28 Fällen nachgewiesen werden (32%) (siehe Abbildung IV-2).



**Abbildung IV-2: E2503-56001-43, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E.**

Fokale hochgradige epidermale Spongiose, mittelgradige korbgeflechtartige orthokeratotische Hyperkeratose, mittelgradiges subepidermales Ödem.

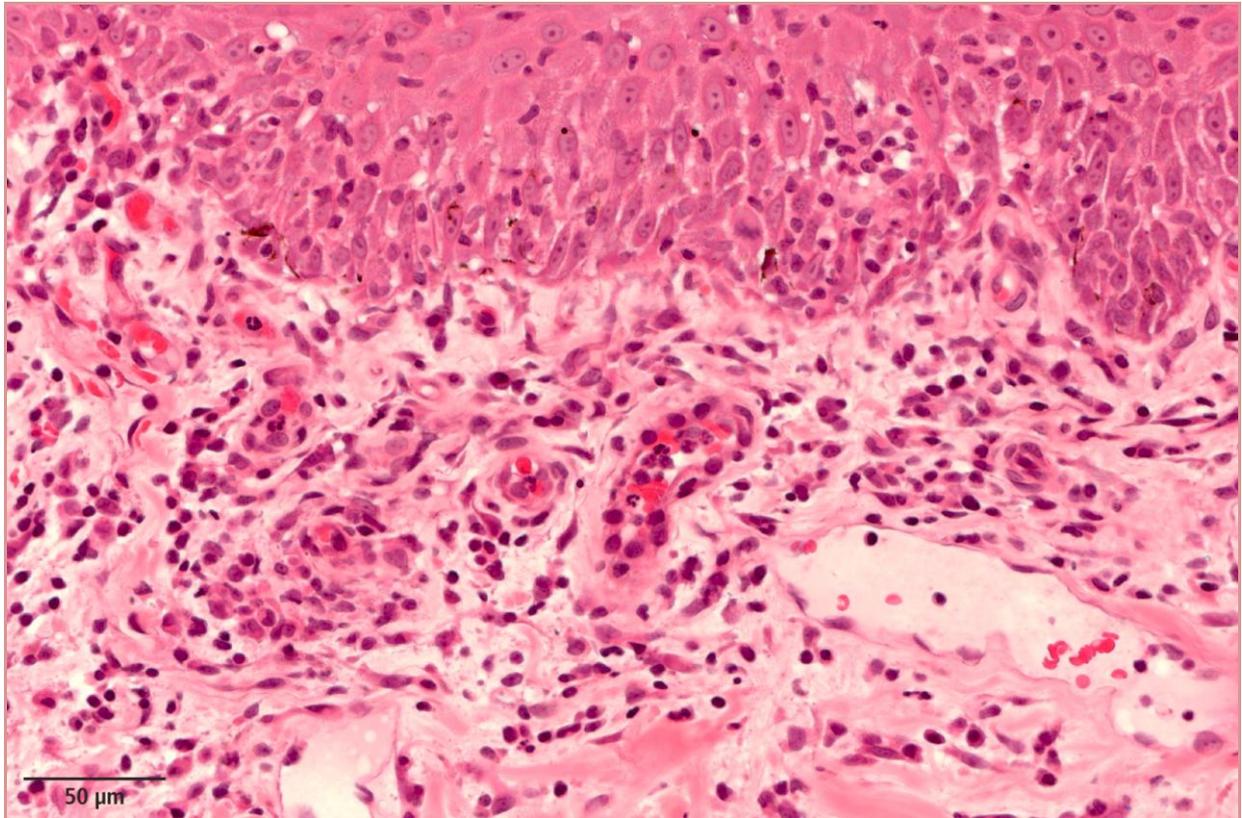
Oberflächliche Ulzerationen wurden in keiner der Biopsien gefunden, in einem Schnitt fand sich eine serozelluläre Kruste (1.7%) (siehe Abbildung IV-3).



**Abbildung IV-3: E2503-56001-34, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E.**

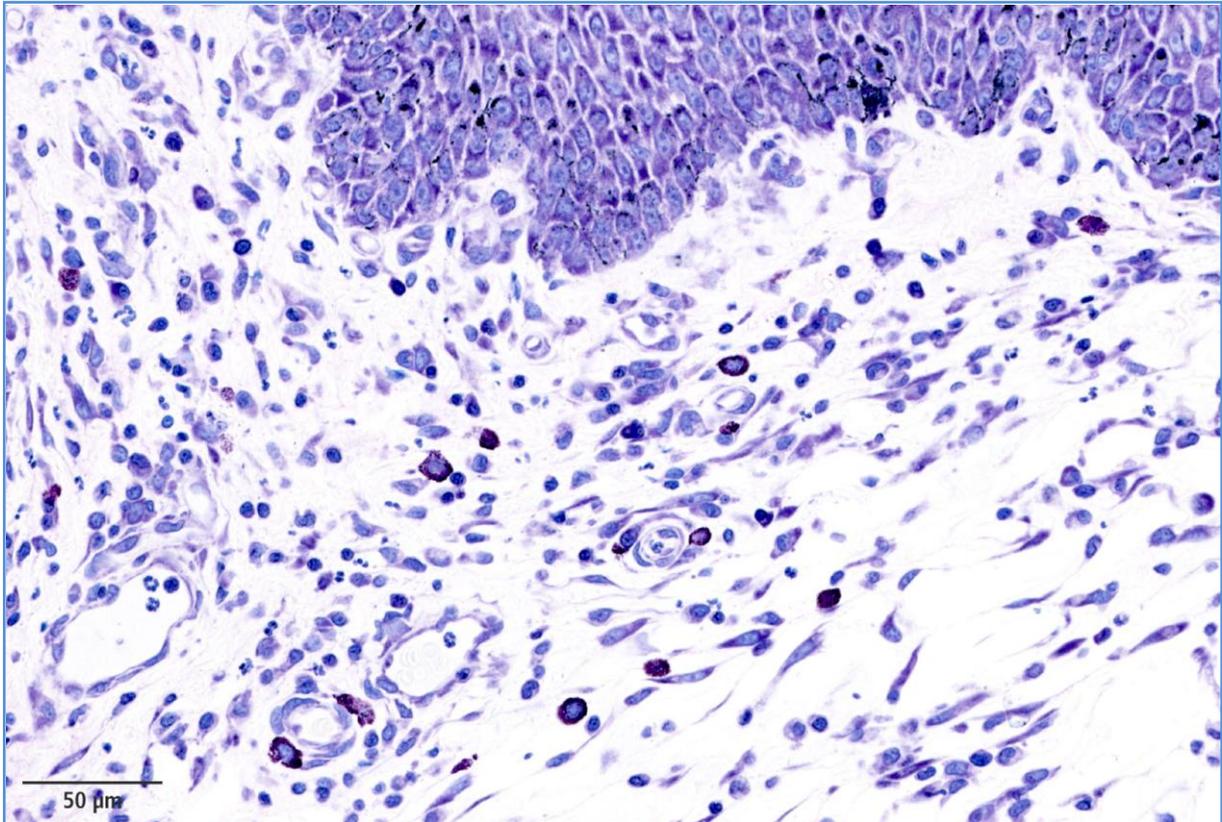
Fokale serozelluläre Kruste, geringgradige epidermale Hyperplasie,  
geringgradiges subepidermales Ödem.

Alle Biopsieproben (56/56) zeigten ein gering- bis mittelgradiges betont subepidermales Ödem (siehe Abbildung IV-3 und Abbildung IV-4). Die gering- bis mittelgradige betont subepidermale und in der Dermis perivaskuläre und periadnexale Infiltration bestand überwiegend aus monomorphen Lymphozyten, reifen Mastzellen, intakten und degranulierten eosinophilen Granulozyten und wenigen Neutrophilen.

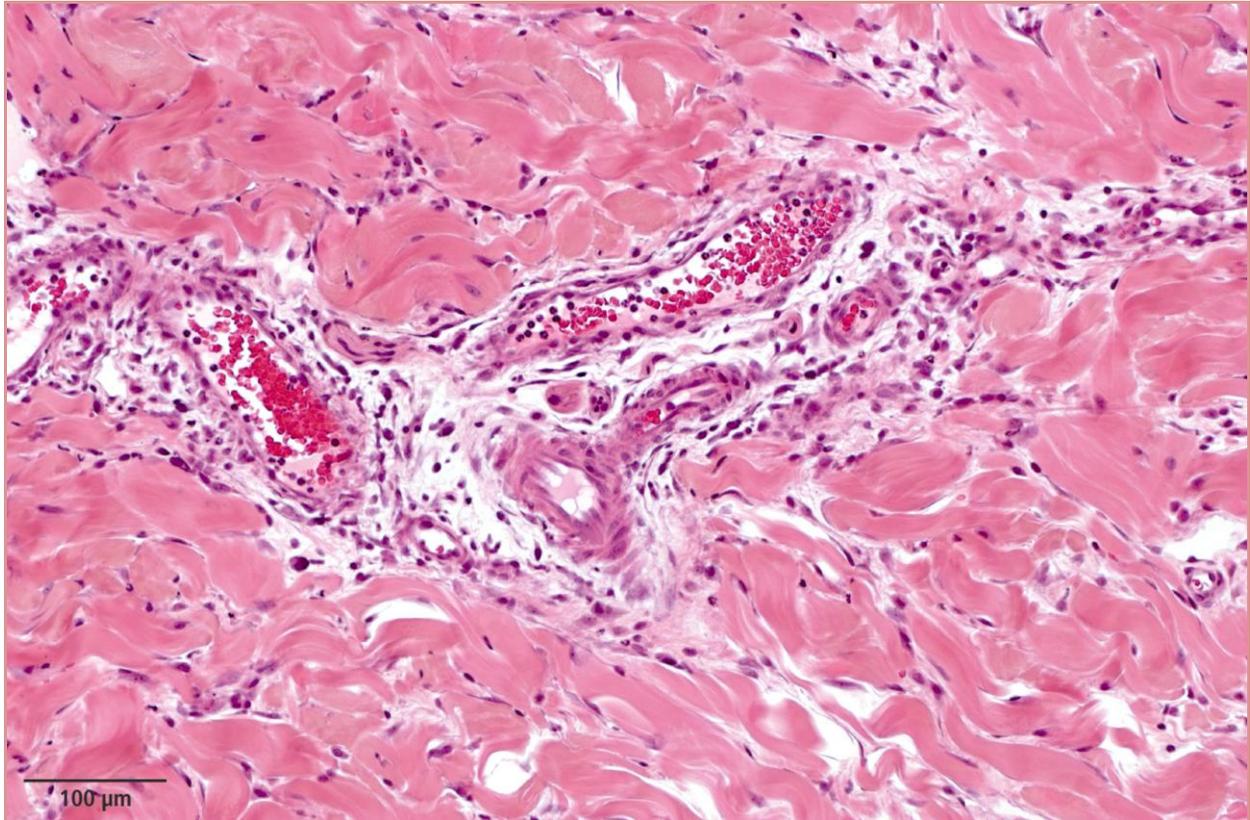


**Abbildung IV-4: E2503-56001-26, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E.**

Mittelgradige gemischtzellige (Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile Granulozyten) subepidermale Infiltration. Geringgradige multifokale epidermale Spongiose und gering- bis mittelgradige leukozytäre Exozytose. Geringgradiges subepidermales Ödem.

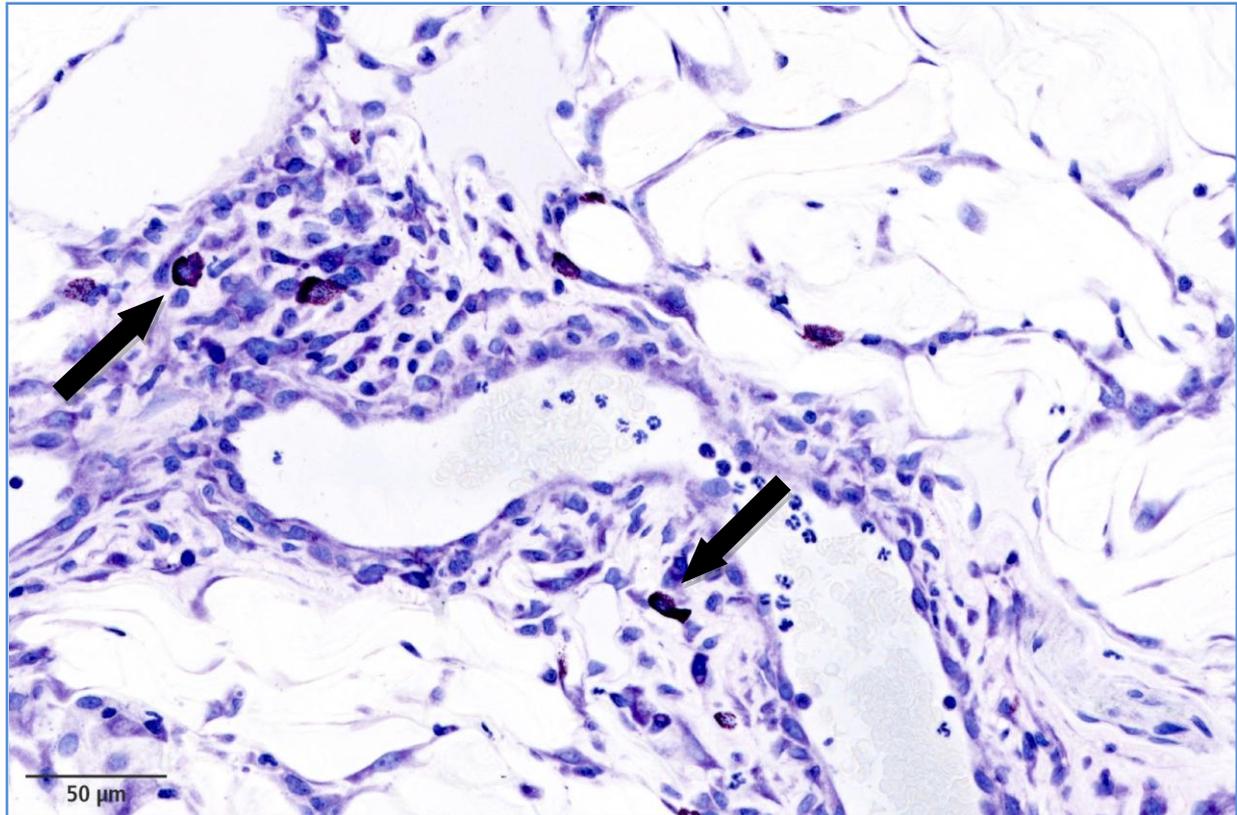


**Abbildung IV-5: E2503-56001-9, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, Giemsa.**  
Mittelgradiges zelluläres Infiltrat mit Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen und wenigen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten.



**Abbildung IV-6: E2503-56001-55, Dermis, H&E.**

Geringgradige gemischtzellige perivaskuläre Infiltration. Neutrophile Granulozyten in den Gefäßen zeigen sog. „Sticking“ und „Rolling“.



**Abbildung IV-7: E2503-56001-38, Dermis, Giemsa**

Geringgradige perivaskuläre Infiltration mit Plasmazellen, Lymphozyten  
und reifen Mastzellen (einzelne markiert mit Pfeilen).

Die histologischen Befunde stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein (siehe 2.1.2.4) und erhärten die klinische Diagnose einer atopischen Dermatitis. Erreger (Bakterien, Pilze oder Parasiten) konnten in keiner der untersuchten Biopsieproben gefunden werden.

#### 4.2. Bestimmungen der Zellzahlen und der Numbers of Profiles per Area

Mastzellen wurden in allen 28 Biopsien nachgewiesen. Die ermittelten Werte reichen dabei von 0,03 Mastzellen/mm<sup>2</sup> bis zu 0,8 Mastzellen/mm<sup>2</sup> mit einem Mittelwert von 0,27±0,15 Mastzellen/mm<sup>2</sup> (Mittelwert±SD).

Intakte eosinophile Granulozyten konnten in 93% der Biopsien nachgewiesen werden (26/28), jedoch nur in 46% der Schnitte (26/56). Freie eosinophile Granula konnten in allen Schnitten gefunden werden, in denen intakte eosinophile Granulozyten nachgewiesen wurden. Die errechneten Werte reichten von 0,0007 eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> bis zu 0,9 eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> mit einem Mittelwert von 0,01±0,01 eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> (Mittelwert±SD). Eine Zusammenstellung aller gefundenen Werte ist im Anhang (9.7.1 und 9.7.2) zu finden.

#### 4.3. Auswertung des Variationskoeffizienten

Die errechneten CV-Werte lagen zwischen 0,12% und 20,34% mit einem Mittelwert von 12,76%. So kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Zellzahlen repräsentative Werte innerhalb einer Biopsieprobe darstellen. Eine Übersicht aller berechneten CV Werte ist in Anhang 9.8 dargestellt.

#### 4.4. Statistische Berechnungen

Im Vergleich der Gruppen (LO, KP und PB) konnten für beide Zellarten weder vor und nach Fettsäuregabe noch im Vergleich der Gruppen untereinander statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine Übersicht der statistischen P-Werte sind Tabelle IV-1 und Tabelle IV-2 zu entnehmen, eine Übersicht aller weiteren statistisch relevanten Werte ist im Anhang (siehe 0) zu finden.

	Mastzellen	Eosinophile Granulozyten
Kruskal Wallis	P=0.0150	P=0.7375
KP prä-post:	P=0.6523	P=0.8438
LO prä-post:	P=0.9658	P=0.9990
PB prä-post:	P=0.6523	P=0.8125

**Tabelle IV-1: P-Werte der NA vor und nach Fettsäuregaben.**  
Zur Errechnung der Werte fand der Wilcoxon Rangsummentest Anwendung.

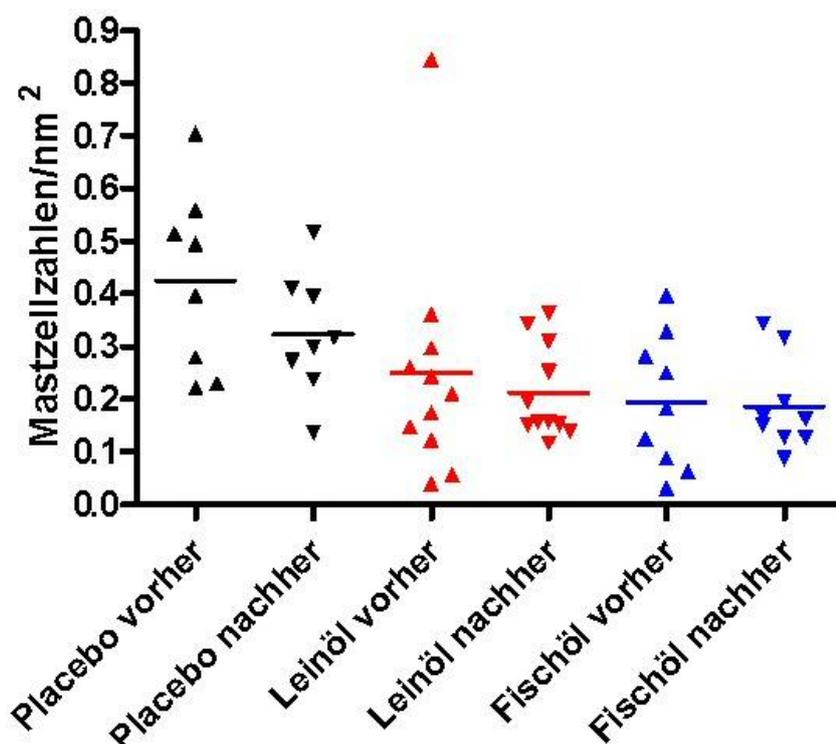
	Mastzellen	Eosinophile Granulozyten
post PB - post KP:	P=0.0274	P=0.5912
post PB - post LO:	P=0.0754	P=0.4781
post LO – post KP:	P=0.5027	P=0.8770

**Tabelle IV-2: Statistische Werte für die Gruppenvergleiche untereinander.**

Dabei wurden jeweils die post-PB Werte (Plazebo) mit den post-KP Werten (Kommerzielles Produkt), die post-PB Werte mit den post-LO Werten (Leinöl) und die post-LO mit den post-KP Werten verglichen. Hierzu fand der Mann-Whitney-Test Anwendung.

Obwohl sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen lassen konnten, war doch eine Tendenz hin zu einer geringeren Anzahl an Mastzellen pro Flächeneinheit zu erkennen.

Dieser ist in Abbildung IV-8 graphisch dargestellt. Wie zu sehen ist, nahmen die Mastzellzahlen tendenziell nach der Behandlung mit Fettsäuren ab. Dieser Trend konnte in ähnlicher Form jedoch auch für die Plazebogruppe gezeigt werden.



**Abbildung IV-8: Graphische Darstellung der Mastzell-NAs vor und nach Fettsäuregabe.**

#### 4.5. Korrelation der pathologischen und klinischen Befunde

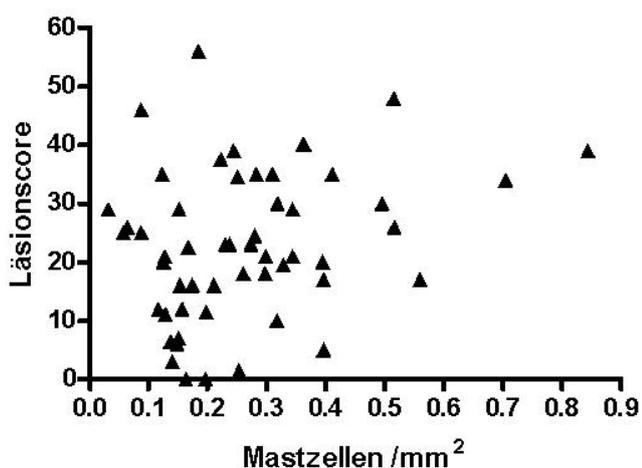
Nach Berechnung der statistischen Werte wurde eine Korrelation zwischen klinischen und pathologischen Befunden erstellt. Hierzu wurden jeweils die klinischen Scores und die Pruritus Scores mit den Ergebnissen der Zellzählung korreliert (siehe 3.11).

	Mastzellen (Pearsons Korrelations Test)	Eosinophile Granulozyten (Spearman Korrelation)
Pruritus Score/NA	r=0,3074 P=0,0238	r=0,08028 P=0,5639
Klinischer Score/NA	r=0,2779 P=0,0419	r=0,1042 P=0,4535

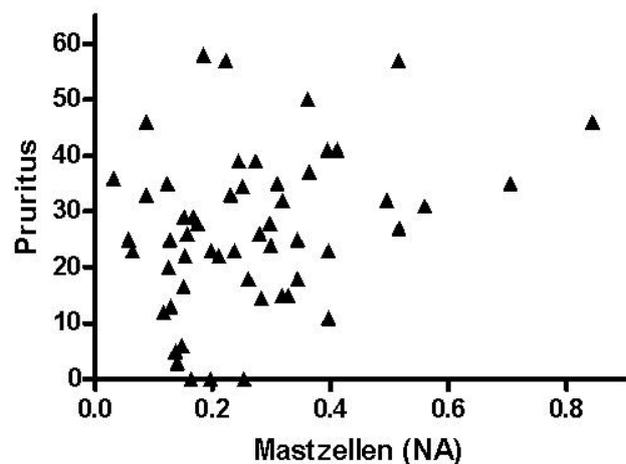
**Tabelle IV-3: Korrelationswerte für Pruritus und klinischen Scores in Verbindung mit Zellzahlen/mm<sup>2</sup> (NA)**

Die Werte zeigen eine Korrelation zwischen NA der Mastzellzahlen und den Pruritus Scores, sowie NA der Mastzellzahlen und den klinischen Scores. Diese Korrelationen sind in Abbildung IV- 9 und Abbildung IV-10 graphisch dargestellt.

Es konnte keine Korrelation zwischen NA der eosinophilen Granulozyten und den Pruritus- oder klinischen Scores festgestellt werden.



**Abbildung IV-9: Korrelation NA und Mastzellen und Pruritus**



**Abbildung IV-10: Korrelation NA Mastzellen und Läsionscores**

## V Diskussion

Essentielle Fettsäuren spielen in der Pathogenese der atopischen Dermatitis in verschiedener Hinsicht eine wichtige Rolle. Sie haben zum einen Einfluss auf die Beschaffenheit der Haut, zum anderen hat das Verhältnis mehrfach ungesättigter n6- und n3-Fettsäuren vielfältige Auswirkungen auf die Funktion des Immunsystems (Olivry und Hill, 2001b; Olivry et al., 2001c). Es werden unter anderem eine Minderung der MHC II Expression und damit der Antigenpräsentation, ein Einfluss auf die Second Messenger und die Regulatoren der Signatransduktion oder Transkriptionsfaktoren, eine Modulation der T-Zellproliferation und Membranstruktur sowie eine Inhibierung der IL-2 Produktion und des IL-2 Rezeptorsignalweges beschrieben (Richieri und Kleinfeld, 1990; Hughes et al., 1996; Hwang, 2000; Fan et al., 2004; Li et al., 2005). Erste Hinweise auf einen Einfluss essentieller Fettsäuren auf die epidermale Lipidbarriere konnten bereits 1930 von Burr und Burr gefunden werden, deren Studie an Ratten die positiven Auswirkungen einer alleinigen Zufuhr von LA auf die Symptome eines Fettsäuremangels beschrieb. Watson (1998) stellte fest, dass auch beim Hund Fettsäuremangelerscheinungen, die Haut und Haarkleid betrafen, durch eine fettsäurenreiche Diät verschwanden. Neben der Beeinflussung der epidermalen Lipidbarriere und ihren immunmodulatorischen Eigenschaften spielen Fettsäuren auch eine Rolle bei der Fettsäurezusammensetzung von Zellmembranen und Lipidmediatoren, welche unterschiedliche Wirkungen in Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat aufweisen (Sardesai, 1992c). Viele dieser Entzündungsmediatoren werden in der Haut vor allem von Mastzellen gebildet und freigesetzt. Daher sind Mastzellen von großer Bedeutung für die Ausprägung des klinischen Bildes der CAD.

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der IgE-medierten Immunantwort im Zusammenhang mit der caninen und humanen AD (Olivry et al., 1996; Müller et al., 1999; Halliwell und DeBoer, 2001; Leung et al., 2004). Obwohl diese Studien zeigen, dass IgE-medierte Reaktionen eine wichtige Rolle beim Antigenkontakt und in der Effektorphase dieser Erkrankung spielen, wird auch eine Ähnlichkeiten der CAD mit einer Kontaktallergie (Typ IV Hypersensitivitätsreaktion) diskutiert (Marsella, 2005). Während der Entwicklung der humanen AD zeigt sich ein biphasisches Zytokinexpressionsmuster. Akute Läsionen sind dabei durch CD4+ Th2 Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und die Freisetzung von IL-4 und IL-13

charakterisiert (Rhodes et al., 1987). Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung hoher IgE-Konzentrationen und führen zu einer Ausreifung und längeren Lebensdauer der eosinophilen Granulozyten. Ähnliche immunologische Veränderungen konnten auch an einem caninen Atopiemodel gezeigt werden (Marsella et al., 2006b), wobei akute Läsionen eine Prädominanz von proinflammatorischem IL-6 und IL-13 zeigen. IgE könnte die Effektivität der epikutanen Erfassung (Capture) von Allergenen verbessern, eine solche Erfassung könnte aber auch in der Abwesenheit von IgE auftreten. Langerhanszellen wandern in diesem Fall, ähnlich Hypersensitivitätsreaktionen, zu den regionären Lymphknoten. In Patienten mit hohen allergenspezifischen IgE-Spiegeln degranulieren dermale Mastzellen nach Allergenexposition und setzen Histamin, Proteasen, Chemokine und Zytokine frei, was zu einer vermehrten Rekrutierung inflammatorischer Zellen in betroffene Hautareale führt. Das hat die Einwanderung von Granulozyten (neutrophilen und eosinophilen Granulozyten), allergen spezifischen Th2 Lymphozyten und dermalen dendritischen Zellen zur Folge; die darauffolgende Degranulation der eosinophilen Granulozyten führt zu epidermaler und dermaler Schädigung und Entzündung. Dies zeigt die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten bei der CAD.

Da die Gabe essentieller Fettsäuren zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik führen kann, war der Ansatz der vorliegenden Studie die Überlegung, ob PUFA die Anzahl der Zellen im Gewebe beeinflussen können und so, neben anderen Mechanismen, durch eine Reduktion der Entzündungszellen und deren Mediatoren wirken. In den vorliegenden Hautbiopsieproben 28 atopischer Hunde konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den Zellzahlergebnissen vor und nach Behandlung mit unterschiedlichen essentiellen FS bzw. einem Plazebo gefunden werden. Mögliche Ursachen hierfür könnten sein:

- 1) Eine lange Verweildauer der Entzündungszellen im Gewebe mit der Folge, dass es zwar zu einer verminderten Rekrutierung und Entzündungsreaktion kommt, sich dies jedoch nicht mit den Zellzahlen in Verbindung bringen lässt;
- 2) Der eventuell zu kurze Studienzeitrahmen;
- 3) Eine mögliche Beeinflussung der Zellmediatoren ohne sichtbare Auswirkungen auf die Zellzahlen.

Diese Zusammenhänge werden im Folgenden diskutiert.

## 5.1. Interpretation der Studienergebnisse

### 5.1.1. Überlebensdauer von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten

Die Mechanismen des Einwanderns, der Proliferation, Aktivierung und Degranulation sowie der letztendlichen Apoptose von Mastzellen sind einer Vielzahl unterschiedlicher Regulatoren und Mediatoren unterworfen. Wie beschrieben (siehe 2.1.2.3.1) entstehen Mastzellen aus hämatopoetischen, CD34+/c-Kit+ Stammzellen des Knochenmarks. Unter physiologischen Umständen, also in einem sog. steady-state-Zustand, proliferieren die c-Kit+/CD34+ Vorläuferzellen im Knochenmark, treten in noch wenig charakterisierter Form in das periphere Blut über und verlieren dort CD34 und c-Kit, um als Vorläuferzellpool bereit zu stehen. Eine Expression von c-Kit ist nicht sinnvoll, da die Zellen sonst, durch Chemotaxis ausgelöst, ins Gewebe eintreten würden. In pathologischen Situationen wird c-Kit auf den Vorläuferzellen im Blut hochreguliert, die Zellen treten vermehrt ins Gewebe ein und differenzieren dort durch die von den anderen aktivierten Zellen freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Nach Erkenntnissen aus der Humanmedizin können Mastzellen im Gewebe sehr lange, wahrscheinlich mehrere Monate überleben, was dazu führt, dass im steady-state nur sehr wenige Zellen einwandern (Czarnetzki et al., 1984; Kirshenbaum et al., 1992; Du et al., 1996; Grizzi et al., 2002). Eine Vermehrung von reifen Mastzellen im Gewebe durch Proliferation wurde bisher auch in pathologischen Prozessen mit stark erhöhten Mastzellzahlen nicht überzeugend gezeigt (Inoue et al., 2002).

Es ist bekannt, dass die Mastzellenzahl im Gewebe unter normalen Bedingungen relativ konstant ist (Garriga et al., 1988). Die vermehrten Mastzellzahlen in allergisch entzündlichen Prozessen könnten, wenn nicht durch Mastzellproliferation, durch Vermehrung der Vorläuferzellen im Knochenmark, verstärkte Zirkulation im peripheren Blut und/oder vermehrter Einwanderung und Differenzierung im Gewebe verursacht werden. Außerdem wäre auch vorstellbar, dass reife Mastzellen durch den Einfluss von chemotaktischen Faktoren in andere Gewebsregionen einwandern können.

Es ist gut dokumentiert, dass der Erhalt einer Homöostase des Zellsystems durch eine Balance zwischen der Proliferationsrate und dem Zellverlust/Tod erreicht wird (Garriga et al., 1988). Zellen sterben unter physiologischen Bedingungen meist durch Apoptose, einem aktiv programmierten Prozess, der durch diverse Stimuli initiiert

wird. Dazu gehören die Deprivation von Wachstumsfaktoren (Cohen et al., 1992), Medikamente und die Einwirkung physikalischer Faktoren wie ionisierende Strahlung (Yee et al., 1994) oder Hyperthermie (Takano et al., 1991). Zu den intrazellulären Induktionsmechanismen gehören die Tumor Suppressor Gene, das pro-Onkogen c-WUJC und BAX (BCL2 assoziiertes X Protein) (Stewart, 1994). Wie bereits erwähnt, spielen Mastzellen bei allergischen Reaktionen sowohl in der Sofortreaktion als auch in der Spätreaktion eine wichtige Rolle (siehe 2.1.2.3.1). Die Sofortreaktion setzt bereits Minuten nach Aktivierung der Zellen ein, die Spätreaktion beginnt ca. 2-4 Stunden nach dem Challenge und erreicht den Höhepunkt 6 und 12 Stunden danach (Lemanske und Kaliner, 1988). Diverse Mechanismen verhindern den Zelltod im Gewebe und führen so zu einer maximalen Ausnutzung des Zellpotentials. Die Fähigkeit von Wachstumsfaktoren, die Überlebensdauer von Zellen durch die Suppression von Apoptose zu fördern ist fundamental für Ihre Fähigkeit, Zellproliferation und Differenzierung zu unterstützen.

Obwohl aus der Tiermedizin keine eindeutigen Erkenntnisse über die Überlebensdauer von kutanen Mastzellen verfügbar sind, ist anzunehmen, dass sich die Zellen bei Hunden ähnlich denen der Menschen lange im Erfolgsorgan aufhalten. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied in den Zellzahlen vor und nach der Behandlung festgestellt werden. Dennoch korrelierten die Mastzellzahlen positiv mit den klinischen Befunden (Reduzierung der Symptome). Eine lange Überlebensdauer der zum Zeitpunkt des Studienendes eventuell bereits inaktiven Mastzellen in der Haut könnte eine Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse darstellen. Der zu beobachtende Trend einer sehr langsam und in geringem Maße abnehmenden Mastzellzahl würde diese Hypothese weiter unterstützen. Da sich die klinischen Symptome signifikant verbesserten, die Zellzahlen jedoch konstant blieben, wäre es möglich, dass eine Änderung in der Mastzellaktivität zu diesen Befunden führt.

Im Gegensatz zu Mastzellen weisen eosinophilen Granulozyten nur eine Lebensdauer im Gewebe von durchschnittlich 14 Tagen auf (Rothenberg et al., 1988; Alam et al., 1994). Eosinophile sind vorrangig Gewebezellen, auf einen Blut - Eosinophilen kommen etwa 100 Gewebe-Eosinophile (Spry, 1993). Die selektive Wanderung der im peripheren Blutstrom zirkulierenden eosinophilen Granulozyten durch das Gefäßendothel in das extrazelluläre Gewebe wird durch das Zusammenspiel interzellulärer Adhäsionsmoleküle ermöglicht. Zunächst kommt es zu

einer reversiblen Bindung des Blut-Eosinophilen an aktivierte Endothelzellen und zu einem typischen „Rollen“ des Granulozyten entlang der luminalen Oberfläche des Gefäßes. Durch diese Bindung wird die Passagegeschwindigkeit herabgesetzt, der Granulozyt flacht ab und wandert zwischen den Endothelzellen hindurch (Diapedese). Dieser Vorgang wird durch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 gesteuert, die auf vaskulären Endothelzellen exprimiert werden und mit den Eosinophilen-Adhäsionsmolekülen Mac-1, LFA-1 oder VLA-4 interagieren (Adams und Shaw, 1994; Canonica et al., 1994). Bei Patienten mit allergischen Erkrankungen kann es durch eine IL-4 induzierte selektive Aufregulierung von VCAM-1 zu einer Verstärkung der Transmigration eosinophiler Granulozyten kommen (Moser et al., 1992). Die Integrine LFA-1 und VLA-4 sind für die anschließende Passage durch die extrazelluläre Matrix verantwortlich. Nach der Transmigration durch das Gefäßendothel findet unter dem Einfluss lokaler Mediatoren eine gerichtete Bewegung eosinophiler Granulozyten zum Ort der allergischen Entzündung statt. Diese Migration erfolgt entlang eines Konzentrationsgefälles spezifischer Chemotaxine, zu denen Vertreter der Lipid- (PAF, LTB<sub>4</sub>, C5a, di HETE), Zytokin- (IL-5, IL-3, GM-CSF) und Chemokin-Familien (RANTES, MCP-3, Eotaxin, IL-8) zählen (Schweizer et al., 1996). Die im Gewebe stattfindende Aktivierung und Degranulation eosinophiler Granulozyten ist abhängig von IL-3, IL-5, GM-CSF, den Komplement-Faktoren C5a und C3a sowie PAF und TNF- $\alpha$  (Zeck-Kapp et al., 1995). Interessanterweise sind auch eosinophile Granula-Proteine wie MBP und EPO in der Lage, eine Aktivierung und Degranulation Eosinophiler zu verursachen und lassen damit an einen autokrinen Mechanismus denken (Kita et al., 1995). Ein Wiedereintritt der eosinophilen Granulozyten in die Zirkulation ist nicht möglich.

Das vermehrte Vorkommen dieser Zellen insbesondere bei Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis wird auf eine durch IL-3, IL-5 und GM-CSF verursachte Verzögerung des physiologisch vorprogrammierten Zelltodes (Apoptose) zurückgeführt (Akdis et al., 2001). In der vorliegenden Studie konnten auch bei den Zellzahlauswertungen der eosinophilen Granulozyten keine statistisch relevanten Ergebnisse ermittelt werden. Entgegen der in diesem Zusammenhang aufgestellten Hypothese die Mastzellen betreffend, können diese Resultate jedoch nicht durch ein über den Studienzeitraum hinaus anhaltendes Verbleiben der eosinophilen Granulozyten im Gewebe erklärt werden. Man kann also davon ausgehen, dass eine

fortwährende Einwanderung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten stattgefunden hat. In der vorliegenden Studie sind jedoch auch die untersuchten Zellzahlen kritisch zu betrachten. Eosinophile Granulozyten konnten nur in 46% der Schnitte gefunden werden, das bedeutet, dass in 30 der 56 evaluierten Schnitte keine Zellen zu finden waren. Die errechneten Werte reichten von 0,0007 eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> bis zu 0,9 eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> mit einem Mittelwert von 0,01±0,01 eosinophilen Granulozyten/mm<sup>2</sup> (siehe 4.2.). Konkret konnten in 15 Schnitten nur zwischen einem und drei eosinophile Granulozyten gefunden werden, in 5 Schnitten zwischen 4 und 7 und in 6 Schnitten 10 bis 30. Aufgrund dieser oft sehr geringen Zahlen wäre eine Studie mit einer höheren Fallzahl sinnvoll, um die Zahlenentwicklung der eosinophilen Granulozyten genauer zu untersuchen.

### **5.1.2. Einfluss des Studienzeitraumes**

In diesem Zusammenhang ist auch der Studienzeitraum als kritischer Faktor zu erwähnen. Die Tiere wurden für eine Periode von 10 Wochen supplementiert. Obwohl es innerhalb dieser Zeitspanne zu einer signifikanten klinischen Verbesserung kam, ist es denkbar, dass die Zellzahlen erst nach einer längeren Behandlungsphase signifikant zurückgehen. Nichts desto trotz weist die klinische Verbesserung, die nur bei den mit PUFA supplementierten Tieren zu beobachten war, auf den positiven Einfluss der Fettsäuren hin. Eine Erklärung hierfür könnte eine Wirkung von PUFA auf die Zellfunktion anstelle der Zellzahl oder auch das Zusammenwirken verschiedener Entzündungszellpopulationen sein (siehe 5.1.3 und 5.1.4). Trotzdem sollten Folgestudien mit einem längeren Studienrahmen erwogen werden.

### **5.1.3. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Zellmediatoren**

Mastzellen und eosinophile Granulozyten setzen in ihrer Rolle als Effektorzellen zahlreiche wichtige Mediatoren frei (siehe 2.1.2.3.1, 2.1.2.3.2 und 2.1.2.4). Mastzellen sezernieren, wie beschrieben, vasoaktive (Histamin, LCT<sub>4</sub>), chemotaktische (LTB<sub>4</sub>, IL-5, IL-6, RANTES, GM-CSF), immunmodulatorische (IL-1, IL-3, IL-6, IL-10, IL-13, TNF-α) und wachstumshemmende (GM-CSF, PDGF, TNF-β, IL-3) Faktoren. Zu den wichtigsten Botenstoffen der eosinophilen Granulozyten gehören neben den Eosinophilen-spezifischen Proteinen (MBP, EDN, EPO, ECP)

und zahlreichen Enzymen (Arylsulfatase, Kollagenase, Elastase, saure Phosphatase, Protease, Elastase) vor allem chemotaktische (PAF, C5a, LTB<sub>4</sub>) und immunmodulatorische (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6) Zytokine und Eicosanoide.

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der positiven Wirkung essentieller FS auf diese für allergische Reaktionen bedeutenden Mediatoren (siehe 2.1.3.5.5 und 2.1.3.5.7). Es wurde gezeigt, dass n3-Fettsäuren eine Senkung des Spiegels der Zytokine IL-1, IL-2 und der TNF- $\alpha$  Produktion sowie der Lymphozytenproliferation bewirken können (Meydani et al., 1991; Wallace et al., 2000; Chapkin et al., 2002). Der IFN- $\gamma$ -Gehalt im Blutplasma lässt sich durch DGLA erhöhen, was die von IL-4 ausgelöste IgE-Synthese hemmt (Lloyd, 1989; Yoon et al., 2002). Des Weiteren bindet PPAR $\gamma$  EPA und führt so zu einer Hemmung der Bildung von Zytokinen, der Funktion des Nuklearfaktors  $\kappa$ B und der COX-2 Expression (Jump, 2002). Die Beeinflussung der LOX-Aktivität durch EPA oder DHA hemmt die Bildung von LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> und HETE (Ishihara et al., 1998).

Auch Eicosanoide werden durch unterschiedlichste Mechanismen positiv beeinflusst (siehe 2.1.3.5.6.). Mehrere Studien konnten eine leukozytäre Hemmung der PGI<sub>2</sub>- und PGE<sub>2</sub>-Synthese durch verschiedene PUFA zeigen (Spector et al., 1983; Mann et al., 1986; Yerram et al., 1989; Croset et al., 1999). Besonders Mastzellen wurden in diesem Zusammenhang speziell untersucht. In einer Kultur PGD<sub>2</sub> bildender Mastzellen aus Nabelvenenblut wurde durch die Zugabe von EPA und Hemmstoffen der COX-1 eine Senkung von PGD<sub>2</sub> erzielt (Obata et al., 1999). Isolierte Mastzellgranula besitzen die Fähigkeit PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> sowie PGF<sub>2</sub> $\alpha$  aus zugegebener AA zu bilden, was eine Verbindung der Phospholipase A<sub>2</sub> und der COX mit den Mastzellgranula verdeutlicht (Chock und Schmauder-Chock, 1988). Auch die Eicosanoidsynthese kultivierter Mastzellen kann durch die Kulturbedingungen stark verändert werden. Adhärente Mastzellen einer Mastzelllinie aus dem Knochenmark von Mäusen waren nach Aktivierung mit Calcimycin, einem komplexbildenden Calcium Ionophor, oder Anti-IgE nicht mehr zur Eicosanoidsynthese fähig, da sie keine Lipooxygenase- und Phospholipaseaktivität mehr aufwiesen (Xu et al., 1993). In den Mastozytomzelllinien C1 und C2 konnte jedoch eine vergleichbare Freisetzung von PGD<sub>2</sub> wie bei normale Mastzellen gemessen werden (DeVinney und Gold, 1990). Auch zwei Lungenkarzinomzelllinien zeigten nach der Erhöhung des DGLA / AA-Verhältnisses eine verstärkte PGE<sub>1</sub> und eine verminderte PGE<sub>2</sub>-Synthese. Dies war darauf zurückzuführen, dass die COX-1, welche in diesen Zellen stärker aktiv ist

als die COX-2, vorrangig AA und nur zu einem geringen Teil DGLA als Substrat nutzte (Levin et al., 2002).

Neben COX kann auch das Enzyme LOX EPA zu entzündungshemmenden Eicosanoiden abbauen. Weitere Studien zeigten zudem, dass die Produktion und Konzentrationen des Leukotriens B<sub>4</sub> durch günstige Fettsäureverhältnisse vermindert werden kann (Vaughn et al., 1994; Marsella et al., 1997; Bryne et al., 2000). Durch den Einbau von EPA und DHA in die Zellmembran kommt es zusätzlich zur gesteigerten epidermalen Barrierefunktion.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Supplementierung von n3-Fettsäuren bei verschiedenen Zellarten eine Reduktion der entzündungsfördernden Prostaglandine der 2-er Serie und der Leukotriene der 4-er Serie bewirkt. Auch wenn diese Befunde und deren Bedeutung teils weiterhin umstritten sind, bieten sie doch gute Grundlagen für eine Erklärung der positiven Effekte von PUFA. Diesen Zusammenhang unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Obwohl sich die Zellzahlen nicht veränderten, weist die positive Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Bild auf eine Verknüpfung der Fettsäurebehandlung mit der klinischen Verbesserung hin. Ein positiver Einfluss der Fettsäurenbehandlung auf die Mediatoren im Gegensatz zu einem Effekt auf die Zellzahlen wahrscheinlich.

#### **5.1.4. Möglicher Einfluss anderer Zelllinien**

Neben den Mastzellen und eosinophilen Granulozyten trägt eine Vielzahl anderer Zellpopulationen wie dendritischen Zellen, B-Zellen und T-Helferzellen sowie Makrophagen und Keratinozyten zu den immunologischen Veränderungen im Zuge einer AD bei (siehe 2.1.2.2). Nach Aufnahme der allergieauslösenden Allergene durch antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) werden diese prozessiert und T-Zellen in Form von Peptidfragmenten über MHC I und II präsentiert (Lanzavecchia, 1990). Der mit Antigenfragmenten beladene MHC-Komplex wird von T-Zellrezeptoren erkannt und führt in Gegenwart von Co-Stimulatoren zur T-Zellaktivierung. CD8-positive Zellen werden mittels MHC-I-Präsentation aktiviert, CD4-positive durch MHC-II-Präsentation. Aktivierte T-Zellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, die auf andere Leukozyten wirken. Th-1 Zellen produzieren primär IL-2 und IFN- $\gamma$  während Th-2 Zellen vorwiegend IL-4, IL-5 und IL-10 herstellen. Beide T-Zellpopulationen produzieren IL-3 und GM-CSF. Dabei

spielen insbesondere die von Th-2 produzierten Zytokine für die Entstehung einer allergischen Reaktion eine Rolle (siehe 2.1.2.3.1 und 2.1.2.3.2). IL-4 ist als Umschaltfaktor für die IgE-Synthese von B-Zellen wesentlich, während IL-5 besonderes bei der Entwicklung, Adhäsion und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten bedeutsam ist. Keratinozyten setzen proinflammatorische Zytokine und Chemokine (z.B. Eotaxin und TARC) frei, die die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten unterstützen. Dendritische Zellen übernehmen eine sehr ähnliche Funktion. Eingebettet in die Epidermis und Dermis können sie Fremdmaterial aufnehmen und verarbeiten. Anschließend wandern sie in den drainierenden Lymphknoten und präsentieren das Antigen dort rekrutierenden T-Zellen. Durch diese entzündliche Reaktion werden antigenspezifischen T-Zellen aktiviert.

PUFA können auf diese Prozesse Einfluss nehmen. Studien beschreiben eine Inhibierung der T-Zellproliferation und IL-2 Produktion sowie die Modulation der Membranstruktur von T-Zellen (Richieri und Kleinfeld, 1990; Fan et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch PUFA Supplementierung der IL-2-Rezeptor Signalweg sowie die MHC II Expression und Antigenpräsentation gemindert wird (Hughes et al., 1996; Li et al., 2005). Eine EPA-Supplementation soll auch zu einer Verminderung der Th1-Antwort führen, die bei chronischen Entzündungen verstärkt ist (Gil, 2002). Fischöl oder aufgereinigte DHA reduzieren außerdem die NF- $\kappa$ B Aktivität und senken die IL-2 Sekretion und T-Zellaktivität beim Menschen auf ein normales Niveau (Fan et al., 2004). 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). Eine weitere aktuelle Studie von Stehle und Mitarb. untersuchte *in vitro* den Einfluss von PUFA auf periphere Blutleukozyten durch eine Inkubation dieser mit verschiedenen Fettsäuren (LA, GLA, ALA, EPA/DHA, GLA/EPA/DHA) (Stehle et al., 2007). Die Untersuchungen zeigen, dass auch beim Hund ein Einfluss von PUFA auf die Proliferation der Blutleukozyten nachzuweisen ist.

All diese Beobachtungen zeigen, welchen komplexen Steuerungsmechanismen die Entstehung und Aufrechterhaltung einer allergischen Reaktion, insbesondere die der atopische Dermatitis, unterworfen sind, und auf wie vielfältige Weise PUFA Einfluss auf diese haben können. Die vorliegende Studie untersuchte die histopathologischen Veränderungen und insbesondere die Dichte von Mastzellen und eosinophilen

Granulozyten. Andere Zellen wurden in dieser Studie aufgrund des Studienaufbaus und der daraus resultierenden Schwierigkeiten einer immunhistochemischen Anfärbbarkeit anderer Zellarten nicht untersucht. Es ist daher möglich, dass PUFA zwar keine Änderung der Zahlen dieser beiden Zellpopulationen bewirkt, sich jedoch auf die Zahlen anderer Zelllinien auswirken könnte. Weitere Studien über einen längeren Zeitraum mit Untersuchung größerer Stichproben und adäquater Probenaufbereitung zur Beleuchtung weiterer Zelllinien sollten daher unternommen werden.

## VI Zusammenfassung

28 Hunde mit atopischer Dermatitis wurden in eine randomisierte, doppel-verblindete und Plazebo-kontrollierte Studie eingeschlossen, um den möglichen Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf das entzündliche Infiltrat in der Haut erkrankter Tiere zu untersuchen. Die Diagnose „canine atopische Dermatitis“ wurde klinisch anhand des Vorberichts, des Erscheinungsbildes und durch den Ausschluss differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehender Erkrankungen sowie entsprechender Test- und Nachweisverfahren gestellt. Die Tiere wurden einer von drei Gruppen zugeteilt und über einen Zeitraum von 10 Wochen mit einem von zwei Fettsäurepräparaten oder einem Plazebo supplementiert. Zu Beginn und nach Abschluss der Studie wurden Hautstanzbiopsieproben vom lateralen Thorax entnommen und das klinische Bild sowie die Juckreizintensität durch den behandelnden Tierarzt bzw. den Besitzer anhand eines Punktescores bewertet. Die Anzahl der Mastzellen und eosinophilen Granulozyten pro  $\text{mm}^2$  Haut wurde mit Hilfe einer Image Analyse Software für die vor und nach der Behandlung gewonnenen Biopsien bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte hinsichtlich der Zellzahlen weder statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Gruppen vor und nach Fettsäuregabe noch im Vergleich der Gruppen untereinander. Es konnte jedoch eine Korrelation der Zellzahlergebnisse mit der Juckreizintensität und den klinischen Befunden gezeigt werden. Ein Grund für die Konstanz der Zellzahlen könnte eine lange Überlebensdauer eventuell bereits nicht mehr aktiver Zellen, insbesondere der Mastzellen, in der Haut sein, da diese bis zu mehreren Monaten in Geweben verweilen können. Es ist daher möglich, dass eine Abnahme der Zellzahlen aufgrund des Studienzeitraums von nur 10 Wochen nicht beobachtet werden konnte. Die gezeigte Korrelation sowie die zahlreichen Berichte über die Verbesserung klinischer Symptome durch Gabe essentieller Fettsäuren könnten aber auch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Fettsäuren die Mediatoren der Effektorzellen positiv beeinflussen. Da in der vorliegenden Studie nur Mastzellen und eosinophile Granulozyten einbezogen werden konnten, ist auch nicht auszuschließen, dass die Effekte auf andere Zellpopulationen zurückzuführen sind und das in diesen möglicherweise Zellzahlrückgänge zu demonstrieren wären. Aus diesem Grund sind weitere Studien über einen längeren Zeitraum mit Untersuchung einer größeren Stichproben und adäquater Probenaufbereitung zur Beleuchtung weiterer Zelllinien anzuraten.

## VII Summary

The aim of this double-blinded, randomized and placebo-controlled study was to assess the potential influence of polyunsaturated fatty acids on the inflammatory infiltrate in the skin of dogs diagnosed with atopic dermatitis (AD). 28 atopic animals were included in the study. The diagnosis “canine atopic dermatitis” was confirmed based on the case history, clinical findings, the ruling out of differential diagnosis as well as using appropriate tests and detection methods. The animals were assigned to one of three groups and supplemented for 10 weeks with either one of two fatty acid products or a placebo. Skin punch biopsy specimens from the lateral thorax were taken prior to and at the end of the trial. Clinical signs as well as pruritus intensity were evaluated by owner pruritus scores and clinician lesion scores.

The number of mast cells and eosinophils per  $\text{mm}^2$  within the epidermis and dermis were quantified before and after supplementation by utilisation of Image Analysis Software. An evaluation of the results showed no significant differences between cell counts before and after the study, or when comparing groups amongst themselves. However, a positive correlation between cell numbers and the pruritus intensity as well as cell numbers and clinical signs was observed.

The long survival time of inflammatory cells in tissue could be one reason for these findings as mast cells in particular do have the ability to reside up to several months in target organs. The reason that no decline in cell numbers could be found might therefore be due to the short study period of only 10 weeks. The correlations between cell counts and pruritus and clinical changes, in addition to various reports describing beneficial effects of fatty acids could indicate that fatty acids influence the mediators of effector cells rather than cell numbers. Since only mast cells and eosinophils could be evaluated in this study, an effect of other cell lines involved in AD cannot be excluded. It is possible that a decline in numbers might be seen in those cell lines.

Thus, further long term studies with higher numbers of individuals using suitable processing techniques and evaluation methods are recommended.

## VIII Literaturverzeichnis

- Abramovits, W., 2005, Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53, 86-93.
- Adams, D.H., Shaw, S., 1994, Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343, 831-836.
- Akdis, C.A., Akdis, M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P., Hamid, Q., Kapp, A., Leung, D.Y., Lipozencic, J., Luger, T.A., Muraro, A., Novak, N., Platts-Mills, T.A., Rosenwasser, L., Scheynius, A., Simons, F.E., Spergel, J., Turjanmaa, K., Wahn, U., Weidinger, S., Werfel, T., Zuberbier, T., 2006, Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol* 118, 152-169.
- Akdis, M., Trautmann, A., Klunker, S., Blaser, K., Akdis, C.A., 2001, Cytokine network and dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Acta Odontol Scand* 59, 178-182.
- Alam, R., Forsythe, P., Stafford, S., Fukuda, Y., 1994, Transforming growth factor beta abrogates the effects of hematopoietins on eosinophils and induces their apoptosis. *J Exp Med* 179, 1041-1045.
- Auxilia, S.T., Hill, P., 2000, Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanation for the predilection sites of atopic dermatitis? *Vet Dermatol* 11, 247-254.
- Banfield, C.C., Callard, R.E., Harper, J.I., 2001, The role of cutaneous dendritic cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144, 940-946.
- Becker, A.B., Chung, K.F., McDonald, D.M., Lazarus, S.C., Frick, O.L., Gold, W.M., 1986, Cutaneous mast cell heterogeneity: response to antigen in atopic dogs. *J Allergy Clin Immunol* 78, 937-942.
- Befus, A.D., Pearce, F.L., Gauldie, J., Horsewood, P., Bienenstock, J., 1982, Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *J Immunol* 128, 2475-2480.
- Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S., Miglioli, M., 1996, Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 334, 1557-1560.

- Bensignor, E., Carlotti, D.N., 2002, Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Vet Dermatol* 13, 37-42.
- Biagi, P.L., Bordoni, A., Masi, M., Ricci, G., Fanelli, C., Patrizi, A., Ceccolini, E., 1988, A long-term study on the use of evening primrose oil (Efamol) in atopic children. *Drugs Exp Clin Res* 14, 285-290.
- Bjorneboe, A., Soyland, E., Bjorneboe, G.E., Rajka, G., Drevon, C.A., 1987, Effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 117, 463-469.
- Bond, R., Lloyd, D.H., 1992, A double-blind comparison of olive oil and a combination of evening primrose oil and fish oil in the management of canine atopy. *Vet Rec* 131, 558-560.
- Braun-Falco, O., Burg, G., 1974, Celluläres Infiltrate und Capillaren bei Neurodermitis diffusa. Quantitative enzymcytochemische und histochemische Untersuchungen. *Arch Dermatol Forsch* 249, 113-124.
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H., 1997, *Dermatologie und Venerologie*, 4 Edition. Springer, Berlin.
- Brazis, P., Queralt, M., de Mora, F., Ferrer, L., Puigdemont, A., 1998, Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 66, 43-51.
- Bryne, K.P., Campbell, K.L., Davis, C.A., Schaeffer, D.J., Troutt, H.F., 2000, The effects of dietary n-3 vs n-6 fatty acids on ex-vivo LTB<sub>4</sub> generation by canine neutrophils. *Vet Dermatol* 11, 123-131.
- Burr, G.O., Burr, M.M., 1930, On the nature of the fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* 86, 587-621.
- Calder, P.C., Yaqoob, P., Harvey, D.J., Watts, A., Newsholme, E.A., 1994, Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J* 300 ( Pt 2), 509-518.
- Calder, P.C., Zurier, R.B., 2001, Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. *Opin Clin Nutr Metab Care* 4, 115-121.
- Canonica, G.W., Ciprandi, G., Buscaglia, S., Pesce, G., Bagnasco, M., 1994, Adhesion molecules of allergic inflammation: recent insights into their functional roles. *Allergy* 49, 135-141.

- Carucci, J.A., Washenik, K., Weinstein, A., Shupack, J., Cohen, D.E., 1998, The leukotriene antagonist zafirlukast as a therapeutic agent for atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 134, 785-786.
- Chamberlain, K.W., 1974, Atopic (allergic) dermatitis. *Vet Clin North Am* 4, 29-39.
- Chandra, R.K., 1989, Nutritional regulation of immunity and risk of infection in old age. *Immunology* 67, 141-147.
- Chapkin, R.S., Arrington, J.L., Apanasovich, T.V., Carroll, R.J., McMurray, D.N., 2002, Dietary n-3 PUFA affect TcR-mediated activation of purified murine T cells and accessory cell function in co-cultures. *Clin Exp Immunol* 130, 12-18.
- Chavali, S.R., Forse, R.A., 1999, Decreased production of interleukin-6 and prostaglandin E2 associated with inhibition of delta-5 desaturation of omega6 fatty acids in mice fed safflower oil diets supplemented with sesamol. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61, 347-352.
- Chock, S.P., Schmauder-Chock, E.A., 1988, Synthesis of prostaglandins and eicosanoids by the mast cell secretory granule. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 1308-1315.
- Clutterbuck, E.J., Hirst, E.M., Sanderson, C.J., 1989, Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73, 1504-1512.
- Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S., 1992, Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10, 267-293.
- Cormane, R.H., Husz, S., Hamerlinck, F.F., 1973, Immunoglobulin and complement bearing lymphocytes in eczema. *Br J Dermatol* 88, 307.
- Croset, M., Bordet, J.C., Lagarde, M., 1999, Inhibition of prostaglandin H synthase and activation of 12-lipoxygenase by 8,11,14,17-eicosatetraenoic acid in human endothelial cells and platelets. *Biochem Pharmacol* 57, 631-638.
- Czarnetzki, B.M., Figdor, C.G., Kolde, G., Vroom, T., Aalberse, R., de Vries, J.E., 1984, Development of human connective tissue mast cells from purified blood monocytes. *Immunology* 51, 549-554.
- Dapson, R.W., 1993, Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotech Histochem* 68, 75-82.

- DeBoer, D.J., Griffin, C.E., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 323-329.
- DeBoer, D.J., Hillier, A., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 271-276.
- DeMora, F., Garcia, G., Puigdemont, A., Arboix, M., Ferrer, L., 1996, Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 45, 424-427.
- DeVinney, R., Gold, W.M., 1990, Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3, 413-420.
- Du, T., Friend, D.S., Austen, K.F., Katz, H.R., 1996, Tissue-dependent differences in the asynchronous appearance of mast cells in normal mice and in congenic mast cell-deficient mice after infusion of normal bone marrow cells. *Clin Exp Immunol* 103, 316-321.
- Durham, S.R., Varney, V.A., Gaga, M., Jacobson, M.R., Varga, E.M., Frew, A.J., Kay, A.B., 1999, Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy* 29, 1490-1496.
- Elbon, C.L., Jacoby, D.B., Fryer, A.D., 1995, Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 320-328.
- Elsner, J., Kapp, A., 1999, Regulation and modulation of eosinophil effector functions. *Allergy* 54, 15-26.
- Eltoum, I., Fredenburgh, Myers, R.B., Grizzle, W.E., 2001, Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol* 24, 173-190.
- Fan, Y.Y., Ly, L.H., Barhoumi, R., McMurray, D.N., Chapkin, R.S., 2004, Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 173, 6151-6160.
- Fartasch, M., 2005, Atopic Dermatitis and Other Skin Diseases, In: Fluhr, J., Elsner, P., Berardesca, E., Maibach, H. (Eds.) *Bioengineering of the Skin: Water and Stratum Corneum*. CRC Press LLC, pp. 160-169.
- Fartasch, M., Diepgen, T.L., 1992, The barrier function in atopic dry skin. Disturbance of membrane-coating granule exocytosis and formation of epidermal lipids? *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 176, 26-31.

- Fiocchi, A., Sala, M., Signoroni, P., Banderali, G., Agostoni, C., Riva, E., 1994, The efficacy and safety of gamma-linolenic acid in the treatment of infantile atopic dermatitis. *J Int Med Res* 22, 24-32.
- Foreman, R.C., Mercer, P.F., Kroegel, C., Warner, J.A., 1999, Role of the eosinophil in protein oxidation in asthma: possible effects on proteinase/antiproteinase balance. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 183-186.
- Fraenkel-Conrat, H., Brandon, B.A., Olcott, H.S., 1947, The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. Gramicidin. *J Biol Chem* 168, 99-118.
- Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H.S., 1948a, The reaction of formaldehyde with proteins. V. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc* 70, 2673-2684.
- Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H.S., 1948b, Reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. *J Biol Chem* 174, 827-843.
- Frank, L.A., 1994, Atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 12, 565-571.
- Fürst, P., Kuhn, K.S., 2000, Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clin Nutr* 19, 7-14.
- Ganten, D., Ruckpaul, K., 1999, Molekulargenetische Grundlagen der Allergie: Ansätze für eine molekulare Therapie, In: *Handbuch der molekularen Medizin. 4. Immunsystem und Infektologie*. Springer, Düsseldorf.
- Garriga, M.M., Friedman, M.M., Metcalfe, D.D., 1988, A survey of the number and distribution of mast cells in the skin of patients with mast cell disorders. *J Allergy Clin Immunol* 82, 425-432.
- Gil, A., 2002, Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 56, 388-396.
- Gimenez-Arnau, A., Barranco, C., Alberola, M., Wale, C., Serrano, S., Buchanan, M.R., Camarasa, J.G., 1997, Effects of linoleic acid supplements on atopic dermatitis. *Adv Exp Med Biol* 433, 285-289.
- Gleich, G.J., 1994, Eosinophils, In: Frank, M.M., K.F., A., Claman, H.N., Unanue, E.R. (Eds.) *Samter's Immunologic Diseases*. Little Brown, Boston, pp. 205-245.

- Glos, K., Müller, R.S., 2007, The evaluation of commercially available veterinary diets recommended for dogs with atopic dermatitis., In: 22th North American Veterinary Dermatology Forum. Kauai, Lihue, p. 181.
- Griffin, C.E., DeBoer, D.J., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 255-269.
- Griffin, C.E., Hillier, A., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 363-383.
- Grizzi, F., Franceschini, B., Barbieri, B., Gagliano, N., Arosio, B., Chiriva-Internati, M., Annoni, G., Dioguardi, N., 2002, Mast cell density: a quantitative index of acute liver inflammation. *Anal Quant Cytol Histol* 24, 63-69.
- Gundersen, H.J.G., 1984, Stereology and sampling of biological surfaces, In: Echling, P. (Ed.) *The Analysis of Organic and Biological Surfaces*. John Wiley & Sons, New York, pp. 477-506.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B., Østerby, R., 1989, Recent stereological developments for pathology. *J Microsc* 148, 378-393.
- Halliwell, R.E., DeBoer, D.J., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 159-167.
- Halliwell, R.E., Schwartzman, R.M., 1971, Atopic disease in the dog. *Vet Rec* 89, 209-214.
- Hanifin, J.M., Rajka, G., 1980, Diagnostic criteria of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl.* 92, 44-47.
- Hayashiya, S., Tani, K., Morimoto, M., Hayashi, T., Hayasaki, M., Nomura, T., Une, S., Nakaichi, M., Taura, Y., 2002, Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49, 27-31.
- Hayat, M.A., 2002a, Antigen retrieval, In: Hayat, M.A. (Ed.) *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. Kluwer Academic, New York, pp. 71-93.
- Hayat, M.A., 2002b, Factors affecting antigen retrieval, In: Hayat, M.A. (Ed.) *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. Kluwer Academic, New York, pp. 53-69.

- Hayat, M.A., 2002c, Fixation and embedding, In: Hayat, M.A. (Ed.) *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy*. Kluwer Academic, New York, pp. 71-93.
- Henz, B.M., Jablonska, S., van de Kerkhof, P.C., Stingl, G., Blaszczyk, M., Vandervalk, P.G., 1999, Double-blind, multicentre analysis of the efficacy of borage oil in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol* 140, 685-688.
- Hill, P.B., Martin, R.J., 1998, A review of mast cell biology. *Vet Dermatol* 9, 145-166.
- Hillier, A., DeBoer, D.J., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 289-304.
- Hiltunen, J.K., Karki, T., Hassinen, I.E., Osmundsen, H., 1986, beta-Oxidation of polyunsaturated fatty acids by rat liver peroxisomes. A role for 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase in peroxisomal beta-oxidation. *J Biol Chem* 261, 16484-16493.
- Hites, M.J., Kleinbeck, M.L., Loker, J.L., Lee, K.W., 1989, Effect of immunotherapy on the serum concentrations of allergen-specific IgG antibodies in dog sera. *Vet Immunol Immunopathol* 22, 39-51.
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981, Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.
- Hughes, D.A., Pinder, A.C., Piper, Z., Johnson, I.T., Lund, E.K., 1996, Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr* 63, 267-272.
- Hwang, D., 2000, Fatty acids and immune responses - a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr* 20, 431-456.
- Ihrke, P.J., Norton, A.L., Ling, G.V., Stannard, A.A., 1985, Urinary tract infection associated with long-term corticosteroid administration in dogs with chronic skin diseases. *J Am Vet Med Assoc* 186, 43-46.
- Illing, S., Groneuer, K.J., 1991, *Neurodermitis - Atopische Dermatitis: Grundlagen, Ernährung, Therapie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Imam, S.A., Young, L., Chaiwun, B., Taylor, C.R., 1995, Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res* 15, 1153-1158.

- Imokawa, G., 2001, Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 45, S29-32.
- Inoue, T., Yoneda, K., Kakurai, M., Fujita, S., Manabe, M., Demitsu, T., 2002, Alteration of mast cell proliferation/apoptosis and expression of stem cell factor in the regression of mastocytoma - report of a case and a serial immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 29, 305-312.
- Irani, A.M., Sampson, H.A., Schwartz, L.B., 1989, Mast cells in atopic dermatitis. *Allergy* 44 Suppl 9, 31-34.
- Ishihara, K., Murata, M., Kaneniwa, M., Saito, H., Shinohara, K., Maeda-Yamamoto, M., Kawasaki, K., Ooizumi, T., 1998, Effect of tetracosahexaenoic acid on the content and release of histamine, and eicosanoid production in MC/9 mouse mast cell. *Lipids* 33, 1107-1114.
- Jaeger, K., Bettenay, S.V., Burrows, M., Linek, M., (17):210., M.R., 2006, Breed and lesion site predispositions of dogs with atopic dermatitis: A comparison of two continents. *Vet Dermatol* 17, 210-220.
- Janeway, C.A., Travers, P., 1997, Allergie und Hypersensibilität, In: *Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, pp. 435-459.
- Jiang, W.G., Eynard, A.R., Mansel, R.E., 2000, The pathology of essential fatty acid deficiency: is it cell adhesion mediated? *Med Hypotheses* 55, 257-262.
- Jones, M.L., 2002, Lipids, In: M, B.J.a.G. (Ed.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill-Livingstone, Edinburgh, Scotland, pp. 201-230.
- Jump, D.B., 2002, The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 277, 8755-8758.
- Jung, E.G., Moll, I., 2003, *Duale Reihe - Dermatologie*. Thieme, Stuttgart.
- Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Kessler, S.W., Mican, J.M., Zsebo, K.M., Metcalfe, D.D., 1992, Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol* 148, 772-777.
- Kita, H., Abu-Ghazaleh, R.I., Sur, S., Gleich, G.J., 1995, Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J Immunol* 154, 4749-4758.
- Koch, H.J., Peters, S., 1994, 207 Intrakutantests bei Hunden mit Verdacht auf atopische Dermatitis. *Kleintierpraxis* 39, 25-36.

- Krakauer, T., 2004, Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF-kappaB. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3, 317-324.
- Kroegel, C., Virchow, J.C., Munding, A., Kienast, K., Kortsik, C., Luttmann, W., Costabel, U., Langer, M., Matthys, H., Werner, P., 1994, [94 pneumology update. Progress and perspectives in pneumology. Paradigm of change (I)]. *Med Klin (Munich)* 89, 141-153.
- Kube, P., Audige, L., Kuther, K., Welle, M., 1998, Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem Cell Biol* 110, 129-135.
- Lanzavecchia, A., 1990, Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8, 773-793.
- Lemanske, R.F., Jr., Kaliner, M., 1988, Late-phase IgE-mediated reactions. *J Clin Immunol* 8, 1-13.
- Leung, D.Y., 1995, Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 96, 302-318; quiz 319.
- Leung, D.Y., 2000, Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 105, 860-876.
- Leung, D.Y., Bieber, T., 2003, Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151-160.
- Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I., Hamid, Q.A., 2004, New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113, 651-657.
- Leung, T.F., Ma, K.C., Hon, K.L., Lam, C.W., Wan, H., Li, C.Y., Chan, I.H., 2003, Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr Allergy Immunol* 14, 296-301.
- Levin, G., Duffin, K.L., Obukowicz, M.G., Hummert, S.L., Fujiwara, H., Needleman, P., Raz, A., 2002, Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochem J* 365, 489-496.
- Lhotka, J.F., Ferreira, A.V., 1949, A comparison of deformatinizing technics. *Stain Technol* 24, 27-32.
- Li, L., Krilis, S.A., 1999, Mast-cell growth and differentiation. *Allergy* 54, 306-312.

- Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J.L., Metzger, D., Chambon, P., 2005, Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14795-14800.
- Liebich, H.G., 1983, Binde- und Stützgewebe, In: Funktionelle Histologie. Schattauer GmbH, Stuttgart, pp. 46-73.
- Lloyd, D.H., 1989, Inflammatory Mediators and Skin Disease, In: Tschärner, C., Halliwell, R.E., Dijon (Eds.) *Advances in Veterinary Dermatology*. Bailliere Tindall, pp. 163-175.
- Logas, D., Kunkle, G.A., 1994, Double-blinded cross-over study with marine oil supplementation containing high-dose eicosapentaenoic acid for the treatment of canine pruritic disease. *Vet Dermatol* 5, 99-104.
- Luna, L.G., 1968, *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill, New York, 111-112 pp.
- Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Kolar, L.M., Klausner, J.S., 1999, Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 214, 1336-1341.
- Mann, C.J., Kaduce, T.L., Figard, P.H., Spector, A.A., 1986, Docosatetraenoic acid in endothelial cells: formation, retroconversion to arachidonic acid, and effect on prostacyclin production. *Arch Biochem Biophys* 244, 813-823.
- Mantzioris, E., Cleland, L.G., Gibson, R.A., Neumann, M.A., Demasi, M., James, M.J., 2000, Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 72, 42-48.
- Marsella, R., 2001, Update on the role of leukotrienes in the pathogenesis of atopy: a comparative review. *Vet Dermatol* 12, 63-74.
- Marsella, R. 2005. Atopic Dermatitis: A New Paradigm. In Pre-congress of the North American Veterinary Forum, Forum, P.o.t.N.A.V.D., ed. (Sarasota, Florida), pp. 7-10.
- Marsella, R., Kunkle, G.A., Vaughn, D.M., Macdonald, J., 1997, Double-blinded pilot study on the effects of ketoconazole on intradermal skin test and leukotriene C4 concentration in the skin of atopic dogs. *Vet Dermatol* 8, 3-10.

- Marsella, R., Nicklin, C., Lopez, J., 2006a, Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 17, 306-312.
- Marsella, R., Olivry, T., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 331-345.
- Marsella, R., Olivry, T., Maeda, S., 2006b, Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol* 17, 111-120.
- Mason, D.Y., Cordell, J., Brown, M., Pallesen, G., Ralfkiaer, E., Rothbard, J., Crumpton, M., Gatter, K.C., 1989, Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol* 42, 1194-1200.
- Mason, J.T., O'Leary, T.J., 1991, Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem* 39, 225-229.
- Masuda, K., Sakaguchi, M., Fujiwara, S., Kurata, K., Yamashita, K., Odagiri, T., Nakao, Y., Matsuki, N., Ono, K., Watari, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H., 2000, Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Vet Immunol Immunopathol* 73, 193-204.
- Mayser, P., Mrowietz, U., Arenberger, P., Bartak, P., Buchvald, J., Christophers, E., Jablonska, S., Salmhofer, W., Schill, W.B., Kramer, H.J., Schlotzer, E., Mayer, K., Seeger, W., Grimminger, F., 1998, Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 38, 539-547.
- Meurer, R., Van Riper, G., Feeney, W., Cunningham, P., Hora, D., Jr., Springer, M.S., MacIntyre, D.E., Rosen, H., 1993, Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. *J Exp Med* 178, 1913-1921.

- Meydani, M., Natiello, F., Goldin, B., Free, N., Woods, M., Schaefer, E., Blumberg, J.B., Gorbach, S.L., 1991, Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J Nutr* 121, 484-491.
- Miller, H.R., 1996, Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol* 54, 331-336.
- Mimouni, V., Christiansen, E.N., Blond, J.P., Ulmann, L., Poisson, J.P., Bezard, J., 1991, Elongation and desaturation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver. Effect of clofibrate feeding. *Biochim Biophys Acta* 1086, 349-353.
- Minnicozzi, M., Duran, W.N., Gleich, G.J., Egan, R.W., 1994, Eosinophil granule proteins increase microvascular macromolecular transport in the hamster cheek pouch. *J Immunol* 153, 2664-2670.
- Montero, C., 2003, The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 51, 1-4.
- Moqbel, R., Lacy, P., 1999, Exocytotic events in eosinophils and mast cells. *Clin Exp Allergy* 29, 1017-1022.
- Moser, R., Fehr, J., Bruijnzeel, P.L., 1992, IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 149, 1432-1438.
- Müller, R.S., Bettenay, S.V., 1996, Long-term immunotherapy of 146 dogs with atopic dermatitis- a retrospective study. *Austr Vet Pract* 26, 128-132.
- Müller, R.S., Bettenay, S.V., Tideman, L., 2000, Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J* 78, 392-399.
- Müller, R.S., Burrows, A., Tsohalis, J., 1999, Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE antibodies in 84 atopic dogs. *Aust Vet J* 77, 290-294.
- Müller, R.S., Fettman, M.J., Richardson, K., Hansen, R.A., Miller, A., Magowitz, J., Ogilvie, G.K., 2005a, Plasma and skin concentrations of polyunsaturated fatty acids before and after supplementation with n-3 fatty acids in dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 66, 868-873.
- Müller, R.S., Fieseler, K.V., Fettman, M.J., Zabel, S., Rosychuk, R.A., Ogilvie, G.K., Greenwalt, T.L., 2004, Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J Small Anim Pract* 45, 293-297.

- Müller, R.S., Fieseler, K.V., Zabel, S., Rosychuk, R.A.W., 2005b, Conventional and rush immunotherapy in canine atopic dermatitis. , In: Hillier, A., Foster, A.P., Kwochka, K.W. (Eds.) *Advances in Veterinary Dermatology V*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 60-69.
- Müller-Plettenberg, B., 1989. Untersuchungen epidermaler Stoffwechselfvorgänge und der Eicosanoid-Konzentration in Probenmaterial von gesunden und hautkranken Hunden. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Münster, M., Mitsch, A., 1996, Spezifische Immunotherapie caniner Atopien. Eine prospektive klinische Studie mit Tyrosinadsorbaten. *Tierärztl Prax* 24(5), 497-504.
- Nagai, H., Abe, T., Yamaguchi, I., Mito, K., Tsunematsu, M., Kimata, M., Inagaki, N., 2000, Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice. *J Allergy Clin Immunol* 106, S91-98.
- Nakajima, T., Yamada, H., Iikura, M., Miyamasu, M., Izumi, S., Shida, H., Ohta, K., Imai, T., Yoshie, O., Mochizuki, M., Schroder, J.M., Morita, Y., Yamamoto, K., Hirai, K., 1998, Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils. *FEBS Lett* 434, 226-230.
- Nesbitt, G.H., 1978, Canine allergic inhalant dermatitis: a review of 230 cases. *J Am Vet Med Assoc* 172, 55-60.
- Nimmo Wilkie, J.S., Yager, J.A., Eyre, P., Parker, W.M., 1990, Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 27, 179-186.
- Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Seybold, J., Kunkel, G., 2003, The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy* 33, 649-654.
- Noll, S., Schaub-Kuhnen, S., 2000, *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer, München.
- Novak, N., Bieber, T., 2004, Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Dtsch Ärztebl* 101, 92-100.
- Nuttall, T.J., Knight, P.A., McAleese, S.M., Lamb, J.R., Hill, P.B., 2002a, Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 32, 789-795.

- Nuttall, T.J., Knight, P.A., McAleese, S.M., Lamb, J.R., Hill, P.B., 2002b, T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 379-384.
- Obata, T., Nagakura, T., Masaki, T., Maekawa, K., Yamashita, K., 1999, Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclooxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 29, 1129-1135.
- Okamoto, M., Mitsunobu, F., Ashida, K., Mifune, T., Hosaki, Y., Tsugeno, H., Harada, S., Tanizaki, Y., 2000, Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acids compared with n-6 fatty acids on bronchial asthma. *Intern Med* 39, 107-111.
- Olivry, T., Deangelo, K.B., Dunston, S.M., Clarke, K.B., McCall, C.A., 2006, Patch testing of experimentally sensitized beagle dogs: development of a model for skin lesions of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 17, 95-102.
- Olivry, T., DeBoer, D.J., Griffin, C.E., Halliwell, R.E., Hill, P.B., Hillier, A., Marsella, R., Sousa, C.A., 2001a, The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 143-146.
- Olivry, T., Dunston, S.M., Murphy, K.M., Moore, P.F., 2001b, Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Vet Dermatol* 12(1), 49-58.
- Olivry, T., Dunston, S.M., Rivierre, C., Jackson, H.A., Murphy, K.M., Peters, E., Dean, G.A., 2003, A randomized controlled trial of misoprostol monotherapy for canine atopic dermatitis: effects on dermal cellularity and cutaneous tumour necrosis factor-alpha. *Vet Dermatol* 14, 37-46.
- Olivry, T., Hill, P.B., 2001a, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 219-225.
- Olivry, T., Hill, P.B., 2001b, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VIII): is the epidermal lipid barrier defective? *Vet Immunol Immunopathol* 81, 215-218.
- Olivry, T., Hill, P.B., 2001c, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 305-309.
- Olivry, T., Marsella, R., Hillier, A., 2001c, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Vet Immunol Immunopathol* 81, 347-362.

- Olivry, T., Moore, P.F., Affolter, V.K., Naydan, D.K., 1996, Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 288, 579-585.
- Olivry, T., Müller, R.S., 2003, Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 14, 121-146.
- Olivry, T., Naydan, D.K., Moore, P.F., 1997, Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 19, 477-486.
- Olivry, T., Rivierre, C., Jackson, H.A., Murphy, K.M., Davidson, G., Sousa, C.A., 2002, Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Vet Dermatol* 13, 77-87.
- Olivry, T., Sousa, C.A., 2001, The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 81, 317-322.
- Ostlere, L.S., Cowen, T., Rustin, M.H., 1995, Neuropeptides in the skin of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 20, 462-467.
- Oyama, T., Ishikawa, Y., Hayashi, M., Arihiro, K., Horiguchi, J., 2007, The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. *Breast Cancer* 14, 182-188.
- Paradis, M., 1996, Nonsteroidal antipruritic drugs in dogs and cats: an update. *Bull Can Acad Vet Dermatol* 12, 3-7.
- Paradis, M., Scott, D.W., Giroux, D., 1991, Further investigations on the use of nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory agents in the management of canine pruritus. *J Am Anim Hosp Assoc* 27, 44.
- Paterson, S., 1995, Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *J Small Anim Pract* 36, 389-394.
- Prelaud, P., 2002, *Allergologie beim Hund*. Parey Buchverlag im Blackwell Verlag GmbH, Berlin.
- Prose, P.H., Sedlis, E., 1960, Morphologic and histochemical studies of atopic eczema in infants and children. *J Invest Dermatol* 34, 149-165.
- Prottey, C., 1977, Investigation of functions of essential fatty acids in the skin. *Br J Dermatol* 97, 29-38.

- Ramos-Vara, J.A., 2005, Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405-426.
- Rankin, J.A., Harris, P., Ackerman, S.J., 1992, The effects of eosinophil-granule major basic protein on lung-macrophage superoxide anion generation. *J Allergy Clin Immunol* 89, 746-752.
- Reed, G.F., Lynn, F., Meade, B.D., 2002, Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1235-1239.
- Reedy, L.M., Miller, W.H.J., Willemse, A., 1997, Allergic Skin Diseases of dogs and cats, 2nd ed. Edition. W.B.Saunders, Philadelphia.
- Reubsaet, F.A., Veerkamp, J.H., Trijbels, J.M., Monnens, L.A., 1989, Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart and m. quadriceps. *Lipids* 24, 945-950.
- Rhodes, K.H., Kerdel, F., Soter, N.A., 1987, Comparative aspects of canine and human atopic dermatitis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 2, 166-172.
- Richieri, G.V., Kleinfeld, A.M., 1990, Free fatty acids inhibit cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis of allogeneic target cells. *J Immunol* 145, 1074-1077.
- Rohrbach, M.S., Wheatley, C.L., Slifman, N.R., Gleich, G.J., 1990, Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med* 172, 1271-1274.
- Rosser, E.J., 1998, Aqueous hyposensitization in the treatment of canine atopic dermatitis: A retrospective and prospective study of 100 cases, In: Kwochka, K.W.e.a. (Ed.) *Advances in Veterinary Dermatology III*. Butterworth Heinemann, Boston, p. 169.
- Roth, H.P., Kirchgessner, M., 1992, Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf die Stabilität der Erythrozytenmembran bei der Ratte. *Ann Nutr Metab* 36, 113-120.
- Rothenberg, M.E., Owen, W.F., Jr., Silberstein, D.S., Woods, J., Soberman, R.J., Austen, K.F., Stevens, R.L., 1988, Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 81, 1986-1992.
- Ruzicka, T., 1989, Leukotrienes in atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 144, 48-49.
- Ruzicka, T., Simmet, T., Peskar, B.A., Ring, J., 1986, Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol* 86, 105-108.

- Saevik, B.K., Bergvall, K., Holm, B.R., Saijonmaa-Koulumies, L.E., Hedhammar, A., Larsen, S., Kristensen, F., 2004, A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 15, 137-145.
- Sampson, H.A., 1999, Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103, 717-728.
- Sanderson, C.J., 1992, Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109.
- Sardesai, V.M., 1992a, Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. *J Nutr Biochem* 3, 562-579.
- Sardesai, V.M., 1992b, The essential fatty acids. *Nutr Clin Pract* 7, 179-186.
- Sardesai, V.M., 1992c, Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 3, 154-166.
- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Gioulekas, D., Leontidis, L., 1999, Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 69, 61-73.
- Sayers, I., Helm, B.A., 1999, The structural basis of human IgE-Fc receptor interactions. *Clin Exp Allergy* 29, 585-594.
- Scarff, D.H., Lloyd, D.H., 1992, Double blind, placebo-controlled, crossover study of evening primrose oil in the treatment of canine atopy. *Vet Rec* 131, 97-99.
- Schick, R.O., Fadok, V.A., 1986, Responses of atopic dogs to regional allergens: 268 cases (1981-1984). *J Am Vet Med Assoc* 189, 1493-1496.
- Schwartzman, R.M., 1968, Clinical manifestations and treatment of atopy in the dog. *Vet Med Small Anim Clin* 63, 1131-1136.
- Schweizer, R.C., van Kessel-Welmers, B.A., Warringa, R.A., Maikoe, T., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., 1996, Mechanisms involved in eosinophil migration. Platelet-activating factor-induced chemotaxis and interleukin-5-induced chemokinesis are mediated by different signals. *J Leukoc Biol* 59, 347-356.
- Schwenk, U., Morita, E., Engel, R., Schroder, J.M., 1992, Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic acid as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid. *J Biol Chem* 267, 12482-12488.
- Scott, D.W., 1981, Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc* 17, 91-100.

- Scott, D.W., Buerger, R.G., 1988, Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the management of canine pruritus. *J Am Anim Hosp Assoc* 24, 425.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001, *Small animal dermatology*, 6th ed Edition. W B Saunders, Philadelphia.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Jr., Decker, G.A., Wellington, J.R., 1992, 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. *Cornell Vet* 82, 319-329.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Jr., Reinhart, G.A., Mohammed, H.O., Bagladi, M.S., 1997, 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. *Can J Vet Res* 61, 145-153.
- Scott, D.W., Miller, W.H.J., Cayatte, S.M., Decker, G.A., 1994, Failure of terfenadine as an antipruritic agent in atopic dogs: results of a double-blinded, placebo-controlled study. *Can Vet J* 35, 286-288.
- Scott, D.W., Miller, W.H.J., Griffin, C.E., 1995, Immunologisch bedingte Erkrankungen, In: *Kleintierdermatologie.*, W B Saunders, Philadelphia, pp. 368-397.
- Scott, D.W., Paradis, M., 1990, A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). *Can Vet J* 31, 830-835.
- Scott, K.V., White, S.D., Rosychuk, R.A.W., 1993, A retrospective study of hyposensitization in atopic dogs in a flea-scarce environment., In: Ihrke, P.J., Mason, I.S., White, S.D. (Eds.) *Advances in Veterinary Dermatology*. Pergamon Press, New York, pp. 79-87.
- Shi, S.-R., Gu, J., Turrens, J., Cote, R.J., Taylor, C.R., 2000, Development of the antigen retrieval technique: philosophical and theoretical bases, In: Shi, S.-R., Gu, J., Taylor, C.R. (Eds.) *Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. Eaton Publishing, Natick, MA, pp. 17-40.
- Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1997, Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45, 327-343.

- Shi, S.R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1995, Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43, 193-201.
- Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991, Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748.
- Simopoulos, A.P., Leaf, A., Salem, N., Jr., 1999, Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *J Am Coll Nutr* 18, 487-489.
- Smith, W.L., 1989, The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 259, 315-324.
- Smith, W.L., 1992, Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263, F181-191.
- Sompuran, S.R., Vani, K., Messana, E., Bogen, S.A., 2004, A molecular mechanism of formalin fixation and AR. *Am J Clin Pathol* 121, 190-199.
- Spector, A.A., Kaduce, T.L., Figard, P.H., Norton, K.C., Hoak, J.C., Czervionke, R.L., 1983, Eicosapentaenoic acid and prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *J Lipid Res* 24, 1595-1604.
- Spry, C.J., 1993, The natural history of eosinophils., In: Smith, H., Cook, R.M. (Eds.) *Immunopharmacology of eosinophils*. Academic Press, London.
- Stanner, S., 2000, The mediterranean diet and health. *Nutrition Bulletin* 25, 85-87.
- Stehle, M.E., Goebel, T., Hancaruk, M., Müller, R.S., 2007. The influence of polyunsaturated fatty acids on the T cell response in dogs with atopic dermatitis. In: *Proceedings of the 22nd North American Veterinary Dermatology Forum*, Lihue, Kauai. p. 194.
- Stenius-Aarniala, B., Aro, A., Hakulinen, A., Ahola, I., Seppala, E., Vapaatalo, H., 1989, Evening primrose oil and fish oil are ineffective as supplementary treatment of bronchial asthma. *Ann Allergy* 62, 534-537.
- Stewart, B.W., 1994, Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 86, 1286-1296.
- Strom, H., Thomsen, M.K., 1990, Effects of proinflammatory mediators on canine neutrophil chemotaxis and aggregation. *Vet Immunol Immunopathol* 25, 209-217.

- Sture, G.H., Halliwell, R.E., Thoday, K.L., van den Broek, A.H., Henfrey, J.I., Lloyd, D.H., Mason, I.S., Ferguson, E., 1995, Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 293-308.
- Takano, Y.S., Harmon, B.V., Kerr, J.F., 1991, Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 163, 329-336.
- Taylor, C., Shi, S.-R., Barr, N., Wu, N., 2002, Techniques of Immunohistochemistry, In: Dabbs, D.J. (Ed.) *Diagnostic Immunohistochemistry*. Churchill-Livingstone, New York, Edinburgh, London, Philadelphia.
- Taylor, M.L., Metcalfe, D.D., 2001, Mast cells in allergy and host defense. *Allergy Asthma Proc* 22, 115-119.
- Terada, N., Konno, A., Togawa, K., 1994, Biochemical properties of eosinophils and their preferential accumulation mechanism in nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 94, 629-642.
- Tupker, R.A., De Monchy, J.G., Coenraads, P.J., Homan, A., van der Meer, J.B., 1996, Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1064-1070.
- Van Hecke, D., 2002, Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *J Histotechnol* 25, 45-54.
- Vaughn, D.M., Reinhart, G.A., Swaim, F.S., Lauten, S.D., Garner, C.A., Boudreax, M.K., Spano, J.S., Hofman, C.E., Okuyama, H., 1994, Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene B synthesis in dog skin and neutrophils. *Vet Dermatol* 5, 163-173.
- Waldron, M.K., Spencer, A.L., Bauer, J.E., 1998, Role of long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in the development of the nervous system of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 213, 619-622.
- Wallace, F.A., Miles, E.A., Calder, P.C., 2000, Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 12, 1374-1379.
- Wasmoen, T.L., Bell, M.P., Loegering, D.A., Gleich, G.J., Prendergast, F.G., McKean, D.J., 1988, Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 263, 12559-12563.

- Watson, T.D., 1998, Diet and skin disease in dogs and cats. *J Nutr* 128, 2783S-2789S.
- Weedon, D., 1997, *Skin Pathology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Welle, M.M., Olivry, T., Grimm, S., Suter, M., 1999, Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis. *J Comp Pathol* 120, 187-197.
- Weller, P.F., 1992, Cytokine regulation of eosinophil function. *Clin Immunol Immunopathol* 62, S55-59.
- Weller, P.F., Rand, T.H., Goelz, S.E., Chi-Rosso, G., Lobb, R.R., 1991, Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7430-7433.
- Wilkie, J.S., Yager, J.A., Eyre, P., Parker, W.M., 1990, Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 27, 179-186.
- Willemse, A., 1984, Canine atopic disease: investigations of eosinophils and the nasal mucosa. *Am J Vet Res* 45, 1867-1869.
- Willemse, A., van den Brom, W.E., 1983, Investigations of the symptomatology and the significance of immediate skin test reactivity in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 34, 261-265.
- Willemse, A., Van den Brom, W.E., Rijnberk, A., 1984, Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 184, 1277-1280.
- Willemse, T., 1990, Atopische Dermatitits beim Hund: neue diagnostische Kriterien. *Tierärztl Prax* 18(5), 525-528.
- Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., Capron, M., 1999, Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 95-97.
- Wollenberg, A., Bieber, T., 2000, Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy* 55, 205-213.
- Wright, S., Burton, J.L., 1982, Oral evening-primrose-seed oil improves atopic eczema. *Lancet* 2, 1120-1122.
- Wüthrich, B., Schnyder, U.W., 1991, Häufigkeit, genetische Aspekte und Prognose der Neurodermitis atopica. *Allergologie* 14, 284-290.

- Wüthrich, B., Schudel, P., 1983, Die Neurodermitis atopica nach dem Kleinkindesalter - eine katamnestische Untersuchung anhand von 121 Fällen. *Zschr Hautkrh* 58, 1013-1023.
- Xu, L., Malaviya, R., Olsen, K.M., Jakschik, B.A., 1993, Effect of culture conditions on mast cell eicosanoid synthesis. *Prostaglandins* 45, 385-398.
- Yazdanbakhsh, M., Kreamsner, P.G., van Ree, R., 2002, Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296, 490-494.
- Yee, N.S., Paek, I., Besmer, P., 1994, Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med* 179, 1777-1787.
- Yerram, N.R., Moore, S.A., Spector, A.A., 1989, Eicosapentaenoic acid metabolism in brain microvessel endothelium: effect on prostaglandin formation. *J Lipid Res* 30, 1747-1757.
- Yoon, S., Lee, J., Lee, S., 2002, The therapeutic effect of evening primrose oil in atopic dermatitis patients with dry scaly skin lesions is associated with the normalization of serum gamma-interferon levels. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 20-25.
- Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A., Heath, J.W., 2006, *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 5th ed.. Elsevier Limited, Edinburgh.
- Yousefi, S., Hemmann, S., Weber, M., Holzer, C., Hartung, K., Blaser, K., Simon, H.U., 1995, IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. Evidence for increased secretion in asthma. *J Immunol* 154, 5481-5490.
- Zeck-Kapp, G., Kroegel, C., Riede, U.N., Kapp, A., 1995, Mechanisms of human eosinophil activation by complement protein C5a and platelet-activating factor: similar functional responses are accompanied by different morphologic alterations. *Allergy* 50, 34-47.
- Ziboh, V.A., Chapkin, R.S., 1987, Biologic significance of polyunsaturated fatty acids in the skin. *Arch Dermatol* 123, 1686a-1690.
- Ziboh, V.A., Chapkin, R.S., 1988, Metabolism and function of skin lipids. *Prog Lipid Res* 27, 81-105.
- Ziboh, V.A., Miller, C.C., 1990, Essential fatty acids and polyunsaturated fatty acids: significance in cutaneous biology. *Annu Rev Nutr* 10, 433-450.

- Ziboh, V.A., Miller, C.C., Cho, Y., 2000, Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr* 71, 361S-366S.
- Zur, G., Ihrke, P.J., White, S.D., Kass, P.H., 2002, Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol* 13, 89-102.

## **IX Anhang**

### **9.1. Tabellenverzeichnis**

Tabelle II-1: Mastzellmediatoren und ihre Wirkmechanismen .....	13
Tabelle II-2: Effektormechanismen des eosinophilen Granulozyten. ....	16
Tabelle IV-1: P-Werte der NA vor und nach Fettsäuregaben. ....	53
Tabelle IV-2: Statistische Werte für die Gruppenvergleiche untereinander. ....	54
Tabelle IV-3: Korrelationswerte für Pruritus und klinischen Scores in Verbindung mit Zellzahlen/mm <sup>2</sup> (NA) .....	55

### **9.2. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung II-1: Graphische Darstellung der Mastzellstimulatoren, -modulatoren und –mediatoren sowie deren Wirkspektrum.....	13
Abbildung II-2: Rolle des eosinophilen Granulozyten bei der allergischen Entzündung. ....	17
Abbildung III-1: Altersverteilung der teilnehmenden Hunde .....	33
Abbildung III-2: E2503-56001-47, Epidermis und Dermis mit Gefäßen und Adnexen. ....	44
Abbildung IV-1: E2503-56001-7, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E. ....	46
Abbildung IV-2: E2503-56001-43, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E. ....	47
Abbildung IV-3: E2503-56001-34, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E. ....	48
Abbildung IV-4: E2503-56001-26, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, H&E. ....	49
Abbildung IV-5: E2503-56001-9, Epidermis, subepidermales Bindegewebe, Giemsa. ....	50
Abbildung IV-6: E2503-56001-55, Dermis, H&E. ....	51
Abbildung IV-7: E2503-56001-38, Dermis, Giemsa.....	52
Abbildung IV-8: Graphische Darstellung der Mastzell-NAs vor und nach Fettsäuregabe. ....	54

### 9.3. Lösungen für das Färben und die Immunhistochemische Behandlung der Paraffinschnitte

#### 9.3.1. Phosphatpuffer 0,1M

Puffer A:	
13,61 g	Kaliumdihydrogenphosphat (AppliChem A3620)
1000 ml	Aqua dest.
Puffer B:	
4,45 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Merck-Nr. 1.019.60)
250 ml	Aqua dest.

#### 9.3.2. Giemsa-Gebrauchslösung 7%

97,5 ml	Puffer A
2,5 ml	Puffer B
Mischen und erwärmen	
7 ml	Giemsa-Stammlösung (Merck-Nr. 1.0924.0500)
Auf pH- Wert 5,0 einstellen und filtrieren	

#### 9.3.3. Essigsäure 0,5%

25 m	Essigsäure 100% (Merck-Nr. 1.00063.100)
4975 ml	Aqua dest.

**9.3.4. Eosin 1%**

10 g	Eosin gelblich (AppliChem A0822)
1000 ml	Aqua dest.
Heiß lösen, dann abkühlen lassen	
1,5 ml	Eisessig (Merck-Nr. 1.00063.100)
In der Flasche filtrieren.	

**9.3.5. Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung**

Herzustellen direkt vor Gebrauch aus Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung und Biebrich-Scharlach-Lösung	
<u>Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung</u>	
1 g	Hämatoxylin (Merck-Nr. 1.04302.0100)
100 ml	95% Ethanol
4 ml	30% Eisenchloridlösung (Merck-Nr.1.03943)
95 ml	Aqua dest.
1 ml	37% HCl
<u>Biebrich-Scharlach-Lösung</u>	
0,2 g	Biebrich-Scharlach (CI 26905)
20 ml	Aqua. Dest

**9.3.6. Saure Ethanollösung**

200 ml	70% Ethanol
2 ml	37% HCl

**9.3.7. Lithium-Karbonat-Lösung**

1 g	Lithiumkarbonat (Merck- Nr. 1.04543)
200 ml	Aqua dest.

**9.3.8. Citratpuffer 1nM, pH 6**

4,2 g	Citrat Monohydrat
2 l	Aqua dest.
Einstellen des pH auf 6 mit 2n NaOH	

**9.3.9. TBS-Puffer 0,5M, pH 7,6**

60,5 g	TRIS
700 ml	Aqua dest.
Mit 2M HCl auf pH 7,6 einstellen, auffüllen auf 1000ml mit Aqua dest.	
90g	Natriumchlorid
pH-Wert prüfen und gegebenenfalls auf pH 7,6 einstellen	

#### 9.4. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medikamente

Lidocainhydrochlorid	Lidocaine hydrochloride, Fujisawa, Deerfield, Illinois, USA
3V Caps	3V Caps, DVM Pharmaceuticals, Miami, Florida, USA
Avidin-Biotin-Komplex	Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Avidin-Biotin-Komplex	Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Biebrich-Scharlach	Chroma Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Stuttgart, CI 26905
biotinylierte Ziege anti-Kaninchen-IgG	VECTOR: BA-1000, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Citrat Monohydrat	Citrat Monohydrat, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Nr. 3958.2
DAB (Substrat Chromogenreaktion)	Bio Trend, Nr. 4170, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Nr. 1.019.60
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt Nr.1.03943
Eisessig	Merck, Darmstadt, Nr. 1.00063.100
Eosin gelblich	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0822
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Nr. 1.00063.100
Ethanol 100 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 70 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 95 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 96 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Eukitt	Roti®-Histokitt II, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formaldehyd 4 %	SAV 25000-4-1, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Giemsa-Stammlösung	Merck, Darmstadt, Nr. 1.0924.0500

Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Nr. 1.04302.0100
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A3620
Leinölkapseln	Flaxseed oil capsules, Traco Labs, Champaign, Illinois, USA
Lithiumkarbonat	Merck, Darmstadt Nr. 1.04543
Mayers Hämalan	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0884
NaCl	NeoLab, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	neoLab® Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A2518
Paraffin	SAV LP, Flintsbach am Inn
Plazebokapseln	Paraffin Oil, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RB anti-CD20	LABVISION, Fremont CA, USA, Kat-Nr. RB-90 13-PO
Rb anti-CD3	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Kat-Nr. A045201
Salzsäure, konzentriert (37 %)	neoLab® Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)amino- methan (TRIS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0823
Xylol	SAV LP, Flintsbach am Inn

### 9.5. Verbrauchsmaterialien

Becherglas	100 ml, VWR International, Darmstadt
Biopsiestanze	Disposable biopsy punch, Stiefel Laboratories, Coral Gables, Florida, USA
Einbettkassetten	4x2,5 cm, VWR International, Darmstadt
Färbegestelle	VWR International, Darmstadt
Färbetröge	VWR International, Darmstadt
Handschuhe	Größe M, STERLING, NITRILE, Kimberly-Clark, VWR International, Darmstadt
Messbecher	25 ml, VWR International, Darmstadt
Messbecher	50 ml, VWR International, Darmstadt

Messbecher	100 ml, VWR International, Darmstadt
Messbecher	200 ml, VWR International, Darmstadt
Mikroskopische Deckgläschen	18x24 mm, R. Langenbrinck, Emmerdingen
Objektträger	76x26 mm, StarFrost, VWR International, Darmstadt
Objektträger	76x26 mm, Objektträger geschliffen, VWR International, Darmstadt
Pipettierhilfe	Accu-jet® <i>pr</i> , Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe	10 µl Gilson pipetman, Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	20 µl Gilson pipetman, Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	100 µl Gilson pipetman, Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	200 µl Gilson pipetman. Gilson, Frankreich
Pipettierhilfe	1000 µl Gilson pipetman, Gilson, Frankreich
Wecker	TFA, Dostmann, Wertheim

### 9.6. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Ausgießstation	TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite Medizintechnik, Burgdorf
Einbettungsautomat	Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau
Kamera (Mikroskop)	ColorView III, Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Mikroskop	Olympus BX51TF, Software: analySIS FIVE, Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mikrowelle	Micro-Chef® Moulinex, Moulinex, Ecully, Frankreich
Pipettierhilfe	Accu-jet® <i>pr</i> , Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Rotationsmikrotoms	HM 315, Microm, Walldorf
Waage	Mettler PC 400, Mettler Waagen GmbH, Gießen, Schweiz
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Daglef Platz, Wankendorf
Zentrifuge	Micro Centrifuge, Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## 9.7. Übersichten über die Zellzahlergebnisse

### 9.7.1. Ergebnisse für Mastzellen

Präp	Fläche (µm <sup>2</sup> )	Auswertung Schnitt x				Auswertung Schnitt x+12		x und x+12
		Zellen	NA (mm <sup>2</sup> )	Präp	Fläche (µm <sup>2</sup> )	Zellen	NA (mm <sup>2</sup> )	
1	423861457,12	97	0,2288483615827760	1	441404913,14	85	0,1925669548971260	0,210339852
2	317869425,49	45	0,1415675632553580	2	389097808,95	63	0,1619130166011690	0,152765213
3	452110850,36	99	0,2189728468608300	3	355244024,14	103	0,2899415415906000	0,250199765
4	451123358,89	83	0,1839851525405900	4	471514644,03	67	0,1420952686163810	0,162577305
5	470703686,91	206	0,4376426310835080	5	528758554,61	309	0,5843877083518980	0,515277095
6	392307373,60	179	0,4562748804780560	6	534880321,65	187	0,3496109174911170	0,394742081
7	252754724,72	65	0,2571663104300290	7	273859220,75	82	0,2994239148692240	0,279141867
8	235653905,90	138	0,5856045520355620	8	219474248,80	97	0,4419652899160530	0,516338085
9	451624646,75	127	0,2812069733437330	9	369971835,18	87	0,2351530352511090	0,260468496
10	475888436,52	129	0,2710719364045290	10	434122714,26	101	0,2326531109346890	0,252744156
11	303220326,04	14	0,0461710472475158	11	753290662,70	46	0,0610654057958496	0,056790701
12	430703959,86	45	0,1044801167247850	12	608247665,05	76	0,1249491027536500	0,116463555
13	262166650,66	38	0,1449459719775020	13	379010987,09	42	0,1108147294685860	0,124770415
14	451014186,26	67	0,1485540855279790	14	594346859,77	67	0,1127287860592510	0,128185377
15	391410040,12	155	0,3960041493889110	15	431100329,14	171	0,3966594048794330	0,396347587
16	450197171,70	123	0,2732136222347570	16	594641683,76	162	0,2724329700125490	0,272769335
17	312947462,58	8	0,0255633962775938	17	1424217331,41	46	0,0322984413863713	0,031085134
18	457169007,71	49	0,1071813687577930	18	644955092,86	91	0,1410950948483370	0,127027437
19	426605318,73	128	0,3000431414710320	19	404223375,36	106	0,2622312475264370	0,281646507
20	419425746,41	70	0,1668948570733970	20	465020467,23	103	0,2214956270925940	0,195602624

21	239939016,77	195	0,8127065061157710	21	269575873,07	164	0,6083630487117610	0,704591774
22	526758126,94	194	0,3682904735176440	22	512441760,52	233	0,4546858159326500	0,410893039
23	196688036,23	37	0,1881151528542060	23	248965541,20	62	0,2490304469492580	0,222145642
24	324511921,90	49	0,1509959933462770	24	194602071,98	22	0,1130512115115660	0,136771501
25	1451882576,66	63	0,0433919388611502	25	2366669698,06	85	0,0359154469547128	0,038758144
26	60445711,71	8	0,1323501663506180	26	141845527,24	24	0,1691981443968440	0,15818777
27	476576743,07	193	0,4049715031344950	27	488249871,08	155	0,3174604012841680	0,360686568
28	382341867,51	133	0,3478562284223860	28	457224588,18	172	0,3761827435498440	0,363282737
29	454711074,26	150	0,3298798038823030	29	646496005,86	211	0,3263747928640610	0,327822084
30	405213651,20	108	0,2665260651514790	30	526674418,11	187	0,3550580654193530	0,316561623
31	457041686,62	336	0,7351626992383340	31	420870183,95	405	0,9622919737362880	0,844048275
32	1459672204,42	394	0,2699236162796950	32	1396741065,50	490	0,3508166345954690	0,309479027
33	755888748,22	138	0,1825665487480380	33	532264756,04	86	0,1615737262783130	0,173892319
34	436040656,98	84	0,1926425865463570	34	483326097,15	97	0,2006926598252690	0,196874641
35	406255207,19	32	0,0787682211419238	35	1315469995,64	118	0,0897017798893930	0,087121917
36	531044158,77	41	0,0772063854255809	36	588859672,96	56	0,0950990576727844	0,08661458
37	2486607297,49	140	0,0563016122977348	37	2217664881,94	159	0,0716970365066645	0,063559248
38	611353085,97	126	0,2061002109772340	38	477574442,27	77	0,1612314085192760	0,186421956
39	366031382,11	43	0,1174762659751330	39	378411698,70	48	0,1268459726929680	0,12223903
40	883411269,94	139	0,157344680322710	40	843125687,21	122	0,1446996596719900	0,151169657
41	454423045,30	91	0,2002539284510180	41	402452010,08	106	0,2633854406117370	0,229905164
42	513565808,68	103	0,2005585228984330	42	644278786,81	171	0,2654130533253590	0,236646611
43	552614150,74	79	0,1429568893489460	43	717196087,33	108	0,1505864322295260	0,147266099

44	440532179,38	60	0,1361989039811880	44	411043035,53	59	0,1435372817445390	0,139741033
45	347482207,98	144	0,4144097070094830	45	311597950,51	117	0,3754838560667780	0,396006459
46	400368440,80	56	0,1398711643907370	46	397023622,40	64	0,1611994762757980	0,150490587
47	375202365,27	104	0,2771837536929180	47	373166746,25	78	0,2090218401929750	0,2431955
48	305074541,04	110	0,3605676161144410	48	346261026,70	114	0,3292313925319970	0,343908749
49	271315095,95	133	0,4902049387790430	49	508235816,35	253	0,4978004144158350	0,495156883
50	386418385,91	108	0,2794898067431870	50	532331885,29	184	0,3456490303971960	0,317823035
51	496529143,08	271	0,5457887090352260	51	449298219,85	258	0,5742288497963210	0,559298685
52	459506962,49	160	0,3481992941586430	52	627277691,94	164	0,2614472060895270	0,298127139
53	387657201,74	118	0,3043926424437800	53	512483746,45	149	0,2907409279457740	0,296620213
54	475817553,47	79	0,1660300243735770	54	541797964,37	80	0,1476565163788010	0,156247617
55	582555842,47	97	0,1665076425784800	55	848780330,59	166	0,1955747488688990	0,183744396
56	628916390,17	107	0,1701339028087300	56	895744818,92	147	0,1641092383623700	0,166594387

### 9.7.2. Ergebnisse für eosinophile Granulozyten

Präp	Fläche	Eos	NA (mm <sup>2</sup> )	Präp	Fläche	Eos	NA (mm <sup>2</sup> )
1	381847654,40	1	0,00261884547011637	2	317869435,49	1	0,00314594575114932
3	452110860,34	3	0,00663554066749008	4	451123358,89	2	0,00443337716965277
5	470703686,91	7	0,01487135154167260	6	392307373,60	5	0,01274510839324180
7	252754724,72	0	0	8	235653905,90	2	0,00848702249326901
9	451624646,75	0	0	10	475888436,52	1	0,00210133284034518
11	303220326,04	0	0	12	430703959,86	0	0

13	262166650,66	1	0,00381436768361848	14	451014186,26	0	0
15	391410040,12	10	0,02554865479928460	16	450197171,70	1	0,00222124896125819
17	312947462,58	3	0,00958627360409768	18	457169007,71	9	0,01968637385347230
19	666544335,50	12	0,01800330354769030	20	419425746,41	0	0
21	239939016,77	1	0,00416772567238857	22	526758126,94	4	0,00759361801067308
23	196688036,23	0	0	24	393950746,97	0	0
25	1451882576,66	1	0,00068876093430397	26	60445711,71	0	0
27	491349661,96	4	0,00814084207170093	28	382341867,51	0	0
29	454711074,26	11	0,02419118561803550	30	405213651,20	12	0,02961400723905330
31	321535884,19	30	0,09330218328686630	32	616933525,37	20	0,03241840356788070
33	259700948,89	0	0	34	479813383,07	5	0,01042071808837090
35	268464070,38	0	0	36	311199500,43	0	0
37	758946691,49	0	0	38	415016854,88	0	0
39	493045144,03	0	0	40	845538629,15	2	0,00236535615411274
41	516979291,73	0	0	42	560037471,10	2	0,00357118961356584
43	529443746,12	0	0	44	391053899,67	0	0
45	329233516,61	1	0,00303735783129447	46	391423403,51	0	0
47	422743142,73	0	0	48	295324291,17	0	0
49	293933725,73	0	0	50	303994429,88	0	0
51	575066395,91	0	0	52	778711748,79	0	0

53	553313065,34	0	0	54	639368341,04	0	0
55	780711721,26	0	0	56	654384919,77	0	0

### 9.8. Werte für den Variationskoeffizient in %

Präp	NA (mm <sup>2</sup> ) von x	NA (mm <sup>2</sup> ) von x+12	Mittelwerte	SD	CV in %
1	0,228848362	0,192566955	0,210707658	0,025654829	12,18
2	0,141567563	0,161913017	0,15174029	0,014386408	9,48
3	0,218972847	0,289941542	0,254457194	0,050182445	19,72
4	0,183985153	0,142095269	0,163040211	0,029620621	18,17
5	0,437642631	0,584387708	0,51101517	0,103764439	20,31
6	0,45627488	0,349610917	0,402942899	0,075422812	18,72
7	0,25716631	0,299423915	0,278295113	0,029880639	10,74
8	0,585604552	0,44196529	0,513784921	0,101568296	19,77
9	0,281206973	0,235153035	0,258180004	0,032565052	12,61
10	0,271071936	0,232653111	0,251862524	0,027166212	10,79
11	0,046171047	0,061065406	0,053618227	0,010531902	19,64
12	0,104480117	0,124949103	0,11471461	0,014473759	12,62
13	0,144945972	0,110814729	0,127880351	0,024134433	18,87
14	0,148554086	0,112728786	0,130641436	0,025332312	19,39
15	0,396004149	0,396659405	0,396331777	0,000463336	0,12

16	0,273213622	0,27243297	0,272823296	0,000552004	0,20
17	0,025563396	0,032298441	0,028930919	0,004762396	16,46
18	0,107181369	0,141095095	0,124138232	0,023980626	19,32
19	0,300043141	0,262231248	0,281137194	0,026737047	9,51
20	0,166894857	0,221495627	0,194195242	0,038608575	19,88
21	0,812706506	0,608363049	0,710534777	0,144492644	20,34
22	0,368290474	0,454685816	0,411488145	0,061090732	14,85
23	0,188115153	0,249030447	0,2185728	0,043073618	19,71
24	0,150995993	0,113051212	0,132023602	0,026831013	20,32
25	0,043391939	0,035915447	0,039653693	0,005286678	13,33
26	0,132350166	0,169198144	0,150774155	0,026055455	17,28
27	0,404971503	0,317460401	0,361215952	0,061879694	17,13
28	0,347856228	0,376182744	0,362019486	0,020029871	5,53
29	0,329879804	0,326374793	0,328127298	0,002478417	0,76
30	0,266526065	0,355058065	0,310792065	0,062601578	20,14
31	0,735162699	0,962291974	0,848727336	0,16060465	18,92
32	0,269923616	0,350816635	0,310370125	0,057200002	18,43
33	0,182566549	0,161573726	0,172070138	0,014844167	8,63

34	0,192642587	0,20069266	0,196667623	0,005692261	2,89
35	0,078768221	0,08970178	0,084235001	0,007731194	9,18
36	0,077206385	0,095099058	0,086152722	0,01265203	14,69
37	0,056301612	0,071697037	0,063999324	0,010886209	17,01
38	0,206100211	0,161231409	0,18366581	0,031727034	17,27
39	0,117476266	0,126845973	0,122161119	0,006625383	5,42
40	0,157344608	0,14469966	0,151022134	0,008941329	5,92
41	0,200253928	0,263385441	0,231819685	0,04464072	19,26
42	0,200558523	0,265413053	0,232985788	0,045859078	19,68
43	0,142956889	0,150586432	0,146771661	0,005394902	3,68
44	0,136198904	0,143537282	0,139868093	0,005189017	3,71
45	0,414409707	0,375483856	0,394946782	0,027524733	6,97
46	0,139871164	0,161199476	0,15053532	0,015081394	10,02
47	0,277183754	0,20902184	0,243102797	0,048197751	19,83
48	0,360567616	0,329231393	0,344899504	0,022158056	6,42
49	0,490204939	0,497800414	0,494002677	0,005370812	1,09
50	0,279489807	0,34564903	0,312569419	0,046781636	14,97
51	0,545788709	0,57422885	0,560008779	0,020110216	3,59

52	0,348199294	0,261447206	0,30482325	0,06134299	20,12
53	0,304392642	0,290740928	0,297566785	0,00965322	3,24
54	0,166030024	0,147656516	0,15684327	0,012992032	8,28
55	0,166507643	0,195574749	0,181041196	0,020553548	11,35
56	0,170133903	0,164109238	0,167121571	0,004260081	2,55

### 9.9. Übersicht über die klinischen und Pruritus Scores

Gruppe	PreKlin Scores	PostKlin Scores	PrePruritus Scores	PostPruritus Scores
PO	48	20	57	41
PO	24.5	26	26	27
PO	17	23	23	39
PO	34	35	35	41
PO	37.5	6.5	57	5
PO	23	23	33	23
PO	30	30	32	32
PO	17	21	31	24
KP	34.5	0	34.5	0
KP	20	11	20	13
KP	29	21	36	25
KP	35	0	14.5	0
KP	19.5	10	15	15
KP	46	25	46	33
KP	26	29	23	25
KP	5	7	11	16.5
KP	56	22.5	58	29
LO	16	16	22	22
LO	18	1.5	18	0
LO	25	12	25	12
LO	27	24	27	14
LO	40	40	50	37
LO	39	35	46	35
LO	16	11.5	28	23
LO	35	29	35	29
LO	6	3	6	3
LO	39	21	39	18
LO	18	12	28	26
LO	39	28	41	17

## 9.10. Übersicht über die statistischen Werte

### 9.10.1. Berechnungen Mastzellen

	PB prä	PB post	LO prä	LO post	KP prä	KP post
Proben- größe	8	8	11	11	9	9
Mittelwert	0,4251984502	0,32296875	0,2503913815	0,2128058323	0,1939951028	0,1863571432
SD	0,1734	0,1168	0,2199	0,08901	0,1272	0,08721
Unteres konf. Limit	0,2802	0,2253	0,1027	0,153	0,09622	0,1193
Oberes konf. Limit	0,5702	0,4207	0,3981	0,2726	0,2918	0,2534

### 9.10.2. Berechnungen eosinophile Granulozyten

	PB prä	PB post	LO prä	LO post	KP prä	KP post
Proben- größe	8	8	11	11	9	9
Mittelwert	0,005573467	0,0043272736	0,0095227844	0,0045865232	0,0072520034	0,0059704174
SD	0,009582	0,004781	0,0279	0,009737	0,008629	0,01097
Unteres konf. Limit	-0,002439	0,0003295	-0,009216	-0,001954	0,000619	-0,002465
Oberes konf. Limit	0,01359	0,008325	0,02826	0,01113	0,01389	0,01441

## 9.11. Fragebögen

### 9.11.1. Owner Consent Agreement

#### OWNER CONSENT AGREEMENT

I agree to enter my animal into the study to evaluate essential fatty acid supplementation. I understand that my animal will be entered into a randomized clinical trial. The treatment regimen my pet will receive consists of commonly used fatty acid supplementations for the treatment of atopic dermatitis (airborne allergy) in three groups and a placebo in one group. There is a 25% chance that my animal will receive placebo for the 6 months and a 75% chance that he/she will receive accepted and commonly used formulations of fatty acid supplementations.

I have been informed and understand the potential risks (occasional diarrhea, which should resolve on decreasing the dose of the supplement) and benefits of the treatment (mild to significant improvement of clinical signs) and agree to cooperate to the best of my ability with specific requirements. I agree to administer the fatty acid supplementations on schedule and to present my animal for reexamination as required.

The costs for the reexaminations, supplementations, blood samples and biopsies will be covered by a research grant, in addition all owners and patients that complied for the duration of the study will receive a refund for the intradermal skin test and 3 bags of dog food.

---

Signed

Date

---

Witnessed

Date



### 9.11.3. Client Questionnaire

**What is the main problem?** \_\_\_\_\_

At what age was this condition first noticed? \_\_\_\_\_

Has there ever been any previous dermatitis?  Yes  No

**Do the symptoms vary?**

If the dermatitis has been present for some time are the symptoms worse in:  spring?  summer?

autumn?  winter? Are the symptoms present all year round?  Yes  No

If yes, would there be a time of no symptoms at some stage?  Yes  No

What (if anything) causes a worsening of symptoms? \_\_\_\_\_

What helps? \_\_\_\_\_

**Home details:**

Do you have any other pets - and if so how many?    cats    dogs    birds    other

Do you know of any relative of this pet that has skin problems?  Yes  No

Does any human in the house have skin problems?  Yes  No

Where does this pet sleep? \_\_\_\_\_

Have there been any other illnesses? \_\_\_\_\_

**Bathing and fleas:**

Does bathing:    help    worsen    make no difference

How often do you prefer to bath your pet?  weekly  monthly  rarely

When was the last time a flea was seen on this pet?    other pets?   

What is the current flea treatment on this pet? \_\_\_\_\_

Is flea treatment used on other pets? \_\_\_\_\_

**Medication:**

If previous medications have been used, do you know what they were?    Yes    No

If yes, were they:  shampoos  rinses  injections  tablets  ointments

Last tablet given (date):    Response:  none  some  good

Last injection given (date):    Response:  none  some  good

Is your dog on heartworm tablets?  No  Yes:  daily  monthly

**Diet:**

What do you normally feed your pet?  cans  dry  table scraps  meat

If meat - which types? \_\_\_\_\_

Any other foods? (eg, vitamins, toast, biscuits) \_\_\_\_\_

Have you ever fed a special diet?  No  Yes: What? \_\_\_\_\_

**Symptoms?**

Have any of the following been observed?

sores  scabs  dandruff  hair loss  odour  hives  redness

sweating  ear problems  watery eyes  "heat"  weight loss

weight gain  vomiting  diarrhoea  tiredness  depression

increased appetite  increased thirst

Does your pet:

rub at the face  lick or chew the paws  scratch at the sides  roll on the back  bite at the tail area

lick the stomach area  sneeze  snort  wheeze other? \_\_\_\_\_

**What do you think could be the cause of the problem?** \_\_\_\_\_

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön sei an dieser Stelle allen gesagt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich möchte ich mich als erstes bei meinen beiden Doktorvätern Herrn Prof. W. Hermanns und Herrn Prof. R. Müller für die uneingeschränkte Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die stetige freundliche Zusammenarbeit und Betreuung bedanken. Danke auch für die konstruktive Diskussionsbereitschaft sowie die oft sehr schnelle Durchführung von Korrekturen, sogar über Landesgrenzen hinweg.

Mein ganz besonderer Dank gilt zudem allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Tierpathologie, die mich herzlich aufgenommen haben und mit denen ich alle Probleme und Fragen, nicht nur die Doktorarbeit betreffend, stets besprechen konnte. Die freundlichen Aufmunterungen und das angenehme Arbeitsklima haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Speziell möchte ich mich bei Herrn Prof. R. Wanke, Frau Dr. N. Herbach und Herrn Dr. A. Blutke für den Einblick in die Morphometrie bedanken. Daraus habe ich viel für künftige Arbeiten gelernt und die Qualität meiner Dissertation erheblich verbessert.

Ein großes Dankeschön auch an Frau S. Daum und Frau M. Nützel, die mir im Paraffinlabor immer tatkräftig und ausdauernd bei Fragen und Schnitten geholfen haben und auch Frau E. Kemper, die mit viel Geduld erheblich zur Verbesserung meiner Kenntnisse der Immunhistologie und der Qualität meiner Färbungen beigetragen hat. Frau A. Nehrke und Frau S. Zwirz möchte ich besonders für Ihre große Hilfe bei der Literaturrecherche danken.

Mein tiefer Dank gilt außerdem Marjam O’Gorman, Beate Schmidt und Miriam Leipig für die moralische, freundschaftliche und organisatorische Unterstützung in dieser Zeit.

Aus ganzem Herzen danke ich auch Marie, Peter und meinen Eltern für Ihr Verständnis, Ihre Geduld und Zuwendung, auf die ich mich immer verlassen kann.