

**Skin barrier dysfunction in canine atopic dermatitis**

Szczepanik M., Wilkołek P., Sub-Department of Clinical Diagnostic and Veterinary Dermatology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Skin barrier defects have been shown to be important in the pathogenesis of atopic dermatitis in dogs. This barrier dysfunction is characterized by abnormal intercellular stratum corneum lipid lamelle, abnormal stratum corneum morphology, reduced and abnormal ceramide content, and abnormal filaggrin expression. In association with these changes, there is higher transepidermal water loss in atopic than in normal skin. Atopic inflammation appears to worsen transepidermal water loss and filaggrin expression. It remains unknown, however, if the changes observed are primary, or secondary to atopic inflammation that also exists even in clinically normal skin. It is proposed that canine atopic dermatitis is not primarily due to immunologic aberration and should be changed to include a primary defect in barrier function.

**Keywords:** canine atopic dermatitis, skin barrier, TEWL, ceramide, filaggrin.

Klasyczna definicja atopowego zapalenia skóry u psów opisuje je jako genetycznie uwarunkowaną zapalną i świądową alergiczną chorobę skóry o charakterystycznych objawach klinicznych, związaną z przeciwciałami klasy IgE, które są wytwarzane przeciwko powszechnie występującym alergenom środowiskowym (1). Choroba ta jest jedną z najbardziej powszechnie występujących chorób skóry psów i dotyka około 10% populacji. Taka definicja choroby powodowała, że dotychczas większość badań skupiała się na zaburzeniach dotyczących układu immunologicznego, a jedynie w niewielkim stopniu skupiano się na zaburzeniach dotyczących funkcji bariery skórnej. Obecnie wiadomo, że nie mniej ważne są zmiany dotyczące budowy i funkcji naskórka oraz filmu skórniego. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że tego typu zaburzenia dotyczą osobników atopowych i mogą być stwierdzane w czasie, gdy u zwierząt nie występują kliniczne objawy choroby.

Obecnie uważa się, że podstawową drogą wnikania alergenów do organizmu jest droga przezskórna. Stwierdzono, że ciągła przeznaskórna ekspozycja na alergeny prowadzi do pobudzenia limfocytów Th2 i rozwoju zapalenia skóry. Przypuszcza się więc, że zwiększona penetracja alergenów przez skórę, której funkcja jest upośledzona prowadzi do łatwiejszego rozwoju alergii u osobników, u których wskutek predyspozycji dochodzi do rozwoju nadwrażliwości (2, 3).

## Rola zaburzeń bariery skórnej w atopowym zapaleniu skóry u psów

**Marcin Szczepanik, Piotr Wilkołek**

z Zakładu Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Lublinie

### Zaburzenia dotyczące integralności naskórka

U ludzi najwcześniej stwierdzono, że u osób atopowych dochodzi do różnego typu zaburzeń dotyczących naskórka, prowadzących do łatwiejszego przechodzenia alergenów i tym samym zwiększających ryzyko uczulenia. Zaburzenia te nasilają się w przebiegu choroby, jeśli dochodzi do ekspozycji na alergeny. Badania dotyczące tego problemu zostały w ostatnich latach przeprowadzone u psów i potwierdziły występowanie tych nieprawidłowości (4, 5).

Badanie wykonane u psów z rozpoznaną atopią wykazały występowanie u nich wielu zaburzeń dotyczących naskórka. Stwierdzono, że u takich zwierząt dochodzi do poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych. Postawiono więc wniosek, że u psów atopowych dochodzi do osłabienia połączenia pomiędzy keratynocytami warstwy zrogowaciałej naskórka. Zmiany te stwierdzane były w skórze psów z rozpoznaną atopią, u których w chwili wykonania badania nie stwierdzono klinicznie żadnych zmian związanych z atopowym zapaleniem skóry i przed ekspozycją na alergeny (6). Po ekspozycji na alergeny u psów atopowych przestrzenie międzykomórkowe ulegały znacznemu poszerzeniu w porównaniu do osobników zdrowych, co jest czynnikiem ułatwiającym przenikanie alergenów do skóry.

Do badania zaburzeń dotyczących funkcji skóry od kilku lat stosuje się pomiar parametrów biofizycznych skóry. Najpowszechniej stosowanym jest pomiar przeznaskórkowej utraty wody (transepidermal water loss – TEWL). Parametr ten określa zdolność naskórka do zatrzymania wody i tym samym świadczy o jego integralności. Wzrost wartości tego parametru stwierdzany jest w wielu sytuacjach, dla których typowe jest uszkodzenie naskórka. Metodę tę stosowano już do oceny zaburzeń integralności naskórka w przebiegu atopowego zapalenia skóry. Stwierdzono, początkowo u ludzi, że osoby chore na atopowe zapalenie skóry mają podwyższony poziom przeznaskórkowej utraty wody. Badania wykonane u psów potwierdzają, że przeznaskórkowa utrata wody jest wyższa u psów z atopowym zapaleniem skóry w porównaniu do zdrowych zwierząt. Wzrost przeznaskórkowej utraty wody stwierdzany był przed podaniem

alergenu na skórę, która klinicznie w czasie przeprowadzenia badania nie wykazywała żadnych zmian (7, 8). Dodatkowo dowiedziano, że parametr ten przyjmuje wyższe wartości na okolicach predysponowanych do rozwoju zmian w przebiegu atopowego zapalenia skóry w porównaniu do pozostających okolic ciała. Shimada i wsp. (9) wykazali, że przeznaskórkowa utrata wody jest większa u psów z atopowym zapaleniem skóry w porównaniu do psów zdrowych, również w miejscach, gdzie skóra nie wykazuje w czasie wykonania oznaczenia klinicznych objawów choroby (9). Przeprowadzone przez Hightower i wsp. (8) badania udowodniły, że po ekspozycji na alergeny u psów atopowych w predysponowanych do rozwoju choroby okolicach dochodziło do znaczącego wzrostu przeznaskórkowej utraty wody. Zmiany dotyczące tego parametru były bardziej widoczne u zwierząt młodych, u których można je było stwierdzić w kilku okolicach ciała (pachy, pachwiny, małżowiny uszne, przedramię, broda); u starszych psów zauważalne były tylko w okolicy pach. Wzrost przeznaskórkowej utraty wody w tych szczególnych okolicach prawdopodobnie spowodowany jest zwiększoną absorpcją alergenów. Interesującym odkryciem dokonany w ostatnim czasie przez Cornegliani i wsp. (7) jest to, że na skutek leczenia swoistego (immunoterapii swoistej) dochodzi do obniżenia wartości tego parametru do wartości zbliżonych do stwierdzanych u psów nieatopowych, co świadczy o poprawie integralności naskórka pod wpływem tej formy terapii. Badanie przeznaskórkowej utraty wody wydaje się pomocne w ocenie stanu klinicznego skóry i skuteczności prowadzonego leczenia (7). Opisane fakty dotyczące przeznaskórkowej utraty wody sugerują występowanie defektów naskórka u psów atopowych, które są pierwotne w stosunku do objawów choroby, a okolice predysponowane do rozwoju objawów mają zwiększoną przepuszczalność w stosunku do wody i zapewne alergenów. Wraz z ekspozycją na alergeny dochodzi do dalszego osłabienia bariery skórnej.

### Zaburzenia związane z uwodnieniem naskórka

Inną metodą, którą stosowano do oceny zaburzeń naskórka w przebiegu atopowego zapalenia skóry była ocena jego

uwodnienia. Shimada i wsp. (9) przeprowadzili u psów z atopowym zapaleniem skóry badania dotyczące oceny tego parametru z zastosowaniem korneometru (9). W przypadku psów, u których występowały już zmiany, stwierdzono, że dochodzi do obniżenia zawartości wody w komórkach naskórka, natomiast zawartość wody w skórze psów atopowych, która nie objęta jest procesem chorobowym, nie różni się statystycznie od zawartości wody w naskórku psów zdrowych. Badania te sugerują, że przesuszenie naskórka, bardzo typowe dla tej choroby (odpowiedzialne jest ono przykładowo za rozwój łojotoku), towarzyszy więc pojawieniu się objawów klinicznych choroby.

### Nieprawidłowości lipidów naskórka

Kolejną nieprawidłowością, która została stwierdzona u psów atopowych to zaburzenia dotyczące lipidów naskórka. Są one wytwarzane w jego warstwie ziarnistej w organelach określanych jako ciała lamelarne. Następnie są uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej, gdzie ułożone są w charakterystyczny blaszkowaty sposób, w postaci blaszek lipidowych. Tego typu ich organizacja zabezpiecza przed utratą wody i zapobiega wnikaniu substancji egzogennych. Same lipidy naskórka złożone są z: ceramidów, cholesterolu, kwasów tłuszczowych i estrów cholesterolu. U psów atopowych w badaniach z zastosowaniem mikroskopu elektronowego stwierdzono, że dochodzi do zaburzeń w strukturze blaszek lipidowych położonych pozakomórkowo. U psów chorych są one cieńsze, jak również nie ułożone w sposób ciągły (10). W niektórych obszarach dochodzi do zaburzeń w ich ułożeniu, co w mikroskopie elektronowym widoczne jest jako brak ciągłości ich ułożenia. Po ekspozycji na alergeny dochodzi do dalszej dezorganizacji struktury blaszek lipidowych, tak że przestrzenie międzykomórkowe są wypełnione bezpostaciowym materiałem lipidowym (6). Inman i wsp. (4) wykazali, używając skali półilościowej, że u psów atopowych grubość blaszek lipidowych była aż o połowę mniejsza w miejscach niewykazujących objawów chorobowych w porównaniu do kontrolnej grup psów zdrowych. Wykazano również, że u psów z atopią wiele przestrzeni międzykomórkowych nie jest wcale wypełnionych lipidami. Przykładowo Pin i wsp. (5) zaobserwowali, że u psów atopowych w skórze niezmięnionej wypełnione lipidami jest jedynie nieco ponad 30% przestrzeni międzykomórkowych w warstwie rogowej, podczas gdy u psów zdrowych jest to prawie 90% (5).

W przypadku ekspozycji na alergen dochodzi do uwalniania lipidów do przestrzeni międzykomórkowej, ale nie są one

ułożone w sposób prawidłowy (zachowują kształt owalny, jak ciała lamelarne) i nie są w stanie skompensować narażenia na alergeny. W skórze zwierząt atopowych dochodzi ponadto do zatrzymania lipidów w ciałach lamelarnych warstwy ziarnistej i nie są one uwalniane do przestrzeni międzykomórkowych, które to zjawisko nie występuje w przypadku psów zdrowych. Wykazano też, że ciała lamelarne u psów atopowych były stwierdzane nawet w komórkach warstwy rogowej; u zdrowych zwierząt w tej warstwie naskórka ich nie ma (6). U psów z atopią stwierdzono ponadto, że w miejscach, gdzie występują nieregularne ułożone i poprzerywane blaszki lipidowe, po ekspozycji na alergeny dochodzi do poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych (6).

Dalszymi nieprawidłowościami związanymi z lipidami naskórka, stwierdzanymi u psów z atopowym zapaleniem skóry są zmiany dotyczące ceramidów. Ceramidy (których zidentyfikowano 11) są uważane za jedne z najważniejszych lipidów występujących w naskórku, a spadek ich ilości prowadzi do zwiększenia przez naskórkową utraty wody, a ponadto prowadzi do zwiększonej podatności na zakażenie gronkowcami. U psów atopowych stwierdzono obniżenie ilości ceramidów w naskórku. Podobnie jak w przypadku innych opisanych zaburzeń, obniżenie ilości ceramidów występowało również w skórze, która nie była w chwili badania objęta procesem zapalnym. Badania przeprowadzone przez Shimada i wsp. (9) wykazały, że zaburzenia dotyczące lipidów naskórka dotyczyły wyłącznie ceramidów, natomiast ilość cholesterolu i kwasów tłuszczowych nie ulegała zmianie. Większy spadek poziomu ceramidów obserwowany był w miejscach, gdzie obecne już były zmiany (9). W przeprowadzonych przez Reiter i wsp. (11) badaniach udało się stwierdzić, że zaburzenia w poziomie ceramidów dotyczą obniżenia ilości ceramidów 1 (EOS) i 9 (EOP). Autorzy ci uzyskali odmienne wyniki niż w badaniach Shimady i wsp. (9) odnośnie do cholesterolu. Stwierdzono mianowicie, że wraz ze spadkiem ilości ceramidów, wzrasta poziom cholesterolu, podniesiony jest więc stosunek cholesterolu do ceramidów. Z kolei Yoon i wsp. (12) stwierdzili, że w przypadku psów atopowych obniżeniu ulega poziom ceramidów 1 (EOS), 9 (EOP), 3 (NP) oraz ceramidów 2 (NS) i 10 (NSD) oraz 5 (AS) i 8 (NH), a największy spadek dotyczy czterech ostatnio wymienionych. Spadek ilości tych ceramidów stwierdzany był zarówno w skórze klinicznie niezmięnionej, jak i z widocznymi objawami, przy czym nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy skórą chorą i zdrową u tych psów (12). W badaniach Popa i wsp. (13) wykazano, że u psów atopowych dochodzi do obniżenia całkowitej ilości

lipidów w warstwie rogowej w porównaniu do zwierząt klinicznie zdrowych. Autorzy ci wykazali, że w przypadku ceramidów obniżeniu ulegają ilości ceramidów 7 (AH) i 9 (EOP), stwierdzili ponadto wzrost ilości glukozyloceramidów (które są prekursorami ceramidów), które w przypadku psów nieatopowych praktycznie nie są stwierdzane w warstwie rogowej naskórka (13). Kolejną nieprawidłowością związaną z ceramidami, stwierdzoną u psów atopowych, jest spadek ilości fosforanu sfingiozyny 1 (S1P). S1P jest produktem degradacji ceramidów i wykazuje naturalne właściwości przeciwzapalne. Spadek S1P stwierdzany jest w największym stopniu na skórze już objętej zmianami chorobowymi (14).

Autorzy są zgodni co do tego, że zaburzenia związane z obniżeniem ilości ceramidów mogą być odpowiedzialne za osłabienie funkcji bariery skórnej, co między innymi prowadzi do zwiększonej przepuszczalności naskórka dla alergenów.

### Zaburzenia dotyczące białek naskórka

Kolejnym wykrytym w przebiegu atopowego zapalenia skóry zaburzeniem związanym z funkcją i strukturą naskórka są zaburzenia dotyczące białek, a zwłaszcza filagryny. Filagryna jest białkiem pełniącym istotną rolę w procesie rogowacenia. Swoją nazwę zawdzięcza właściwości spajania włókien keratynowych – filament aggregation protein. Keratyna wraz filagryną stanowią główne składniki białkowe naskórka, szczególnie w jego warstwie ziarnistej. Podczas końcowych faz różnicowania się keratynocytów tworzy się struktura określana mianem „koperty rogowej”. Znajduje się ona bezpośrednio pod błoną komórkową keratynocyta w końcowym stadium różnicowania. W jej skład wchodzi wiele białek, wśród nich: filagryna, lorikryna, trichohialina, inwolukryna i pośrednie filamenty keratynowe. Białka wchodzące w skład koperty rogowej są krzyżowo związane przez transglutaminazę i tworzą cytoskielet keratynocyta. Koperta rogowa jest niezbędna do zapewnienia normalnej barierowej funkcji skóry. Zaburzenia dotyczące filagryny były stwierdzane u ludzi z atopowym zapaleniem skóry (15, 16). Ostatnie badania u psów potwierdzają, że również u tego gatunku dochodzi do nieprawidłowości związanych z tym białkiem. Wykazano, że u psów atopowych dochodzi do obniżenia ekspresji mRNA dla tego białka w niezmięnionej skórze. Istotne obniżenie ekspresji stwierdzane było szczególnie u predysponowanej do atopowego zapalenia skóry rasy, jaką jest west highland white terier (17). U psów z atopowym zapaleniem skóry dochodzi ponadto do zaburzeń związanych z dojrzewaniem i transportem filagryny, co charakteryzuje się jej gromadzeniem w dużych pęcherzykach w obrębie

cytoplazmy komórek naskórka. Zaburzenia te (gromadzenie filagryny w pęcherzykach) dotyczyły wyłącznie peptydów domeny końcowej C filagryny, nie obejmowały natomiast peptydów domeny końcowej N. Różnego rodzaju zaburzenia związane z filagryną stwierdzane były u większości psów atopowych, a u części osobników (około 22%) wykazano z kolei całkowity brak peptydów domeny końcowej C. Przypuszcza się, że u tych zwierząt dochodzi do mutacji prowadzącej do utraty funkcji, powodującej odcięcie peptydów domeny końcowej C filagryny (18). Podobnie jak w większości opisanych powyżej nieprawidłowości, również w tym przypadku zaburzenia te dotyczyły skóry, która nie jest klinicznie zmieniona, a w skórze, która jest już zmieniona nieprawidłowości te nasilają się (zwiększa się liczba oraz wielkość pęcherzyków obecnych w cytoplazmie; 18, 19). Badania Marsella i wsp. (20) wykonane u atopowych psów rasy beagle potwierdzają obniżenie ilości filagryny w naskórku u psów atopowych, stwierdzone przed ekspozycją na alergeny. Po ekspozycji na alergeny roztoczy kurzu domowego dochodzi do obniżenia ilości filagryny zarówno u psów atopowych, jak i, co interesujące, u psów klinicznie zdrowych. Zjawisko to tłumaczy się proteolitycznymi właściwościami alergenów (20).

Wykryto ponadto, że poza filagryną dochodzi do zmniejszenia ekspresji również innych białek tworzących kopertę rogową, takich jak lorikina i desmogleina 1. Również i w tym przypadku zmiany te stwierdzano na skórze klinicznie niezmienionej. W przypadku skóry zmienionej, gdzie ma miejsce przerost naskórka, dochodzi do przedwczesnej ekspresji lorikiny i inwolukryny. W takich przypadkach poziom inwolukryny jest podwyższony, natomiast poziom lorikiny obniżony (18).

Wszystkie opisane w tym artykule zaburzenia dotyczące bariery skórnej sprawiają, że obecnie zmienia się spojrzenia na mechanizmy atopowego zapalenia skóry. Upřednio przyjmowany model wskazujący na podstawową rolę zaburzeń w układzie immunologicznym zastąpiony jest obecnie modelem, w którym za mające podstawowe znaczenie w rozwoju choroby przyjmuje się zaburzenia dotyczące bariery skórnej (21).

### Piśmiennictwo

1. International Task Force on Atopic Dermatitis: Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, **114**, 207-208.
2. Boralevi F, Hubiche T, Leaute-Labrze C, Saubusse E, Fayon M, Roul S.: Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants – determining the role of epidermal barrier impairments. *Allergy* 2008, **63**, 205-10.
3. Kondo H., Ichikawa Y., Imokawa G.: Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eu. J. Immunol.* 1998, **28**, 769-79.
4. Inman A.O., Olivry T., Dunston S.M., Monteiro-Riviere N.A., Gatto H.: Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet. Pathol.* 2001, **38**, 720-723.
5. Pin D., Piekutowska A., Reme C. A., Gatto H. Haftek M.: A qualitative and quantitative evaluation of the effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier structure of atopic dogs. *Vet. Dermatol.* 2008, **19** (Suppl. 1), 1-83.
6. Marsella R., Samuelson D., Doerr K.: Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.*, 2010, **21**, 81-88.
7. Corneglan L., Vercelli A., Sala E. Marsella R.: Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. *Vet. Dermatol.* 2012, **23**, 41-e10.
8. Hightower K., Marsella R. Flynn-Lurie A.: Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2010, **21**, 88-95.
9. Shimada K., Yoon J., Yoshihara T., Iwasaki T. Nishifuji K.: Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2009, **20**, 541-546.
10. Piekutowska A., Pin D., Reme C.A., Gatto H., Haftek M.: Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. *J. Comp. Pathol.* 2008, **138**, 197-203.

11. Reiter L. V., Torres S. M. F., Wertz P. W.: Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet. Dermatol.* 2009, **20**, 260-266.
12. Yoon J., Yoshihara T., Sasaki A., Ide K., Nishifuji K., Iwasaki T.: Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* 2011, **20**, 732-736.
13. Popa L., Remoue N., Hoang L.T., Pin D., Gatto H., Haftek M., Portoukalian J.: Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* 2011, **303**, 433-440.
14. Bäumer W., Rossbach K., Mischke R., Reines I., Langbein-Detsch L., Luth A., Kleuser B.: Decreased concentration and enhanced metabolism of sphingosine-1-phosphate in lesional skin of dogs with atopic dermatitis: disturbed sphingosine-1-phosphate homeostasis in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2011, **131**, 266-268.
15. Henderson J., Northstone K., Lee S., Liao H., Zhao Y., Pembrey M.: The burden of disease associated with filaggrin mutations: A population-based, longitudinal birth cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, **121**, 872-7.
16. Weidinger S., O'Sullivan M., Illig T., Baurecht H., Depner M., Rodriguez E.: Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, **121**, 1203-1209.
17. Roque J.B., O'Leary C.A., Kyaw-Tanner M., Duffy D.L., Shipstone M.: Real-time PCR quantification of canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC Research Notes*, 2011, **4**, 554-560.
18. Chervet L., Galichet A., McLean W.H. L., Chen H., Suter M. M., Eoosje P. J., Muller E.J.: Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* 2010, **19**, e343-e346
19. Marsella R., Samuelson D., Harrington L.: Evaluation of filaggrin expression in sensitized atopic Beagles and in normal controls before and after allergen exposure. *Vet. Dermatol.* 2008, **19**, 19.
20. Marsella R., Samuelson D., Harrington L.: Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet. Dermatol.* 2009, **20**, 547-554.
21. Marsella R., Samuelson D.: Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Vet. Dermatol.* 2009, **20**, 533-540.